

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**CULTURA DE CALOS E SUSPENSÃO CELULAR DE *DUROIA SACCIFERA*:  
ESTUDO FITOQUÍMICO, CINÉTICA DE CRESCIMENTO E AVALIAÇÃO DAS  
ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

ALINE BASTOS BRILHANTE DE SOUSA

MANAUS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

ALINE BASTOS BRILHANTE DE SOUSA

**CULTURA DE CALOS E SUSPENSÃO CELULAR DE *DUROIA SACCIFERA*:  
ESTUDO FITOQUÍMICO, CINÉTICA DE CRESCIMENTO E AVALIAÇÃO DAS  
ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção de título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Cecilia Veronica Nunez

MANAUS

2018

2

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S725c Sousa, Aline Bastos Brilhante de  
Cultura de calos e suspensão celular de *Duroia saccifera*: estudo fitoquímico, cinética de crescimento e avaliação das atividades biológicas / Aline Bastos Brilhante de Sousa. 2018  
105 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cecília Veronica Nunez  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. cultura de tecidos de plantas. 2. metabólitos secundários. 3. biotecnologia. 4. Rubiaceae. I. Nunez, Cecilia Veronica II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico esse trabalho  
**a todos que considero como minha família,**  
com todo o meu amor.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e à Mãe Divina. Honro e reverencio a oportunidade de reconhecer em mim e todos os seres da Criação a manifestação da Vida e do Amor. Agradeço por guiar meu caminho, iluminar meu entendimento e confortar meu coração.

À minha mãe, Pérola, por ser um poço de amor incondicional, cuidado e dedicação.

Ao meu pai, José Itamar, pelo apoio, dedicação e amor (expresso ou silencioso).

Às minhas irmãs, Amanda e Camila, pela presença, que de maneira direta e indireta, fazem minha vida mais completa.

Ao meu namorado, Marcus, que ao longo desses quase 8 anos me acompanha nas alegrias e dificuldades, no sossego e no sufoco. Obrigada pelas incontáveis ajudas, pela paciência, compreensão, carinho e cuidado. Obrigada por ser meu companheiro e melhor amigo. Compartilhar a vida com você é meu maior bem.

À minha amiga-irmã de alma, Allana Feitoza, pela ajuda, carinho e sororidade. Amizade além do tempo, da distância e das diferenças. Obrigada por ser luz nos conselhos, sinceridade nas palavras, amor no abraço. Lealdade infinita a ti!

À minha *sangha* (comunidade espiritual) e, de forma impessoal ao *Yoga*, por me permitirem desfrutar de momentos de puro bem-estar, plenitude, inspiração e amor. O melhor ansiolítico nesses 2 anos de mestrado. SOU GRATA DEMAIS!

A TODXS xs colegas e amigxs do laboratório! Cada um, do seu jeito, é especial para mim. Ana (minha melhor amiga mexicana), David, Leo, Andrei, Vanessinha, Vitor, Jennifer, Bina, Cris, Taís (pela tentativa de purificar, pena que não foi dessa vez rs), Marcos, Júlio, Ju, Stefhania, Carol, Weison, Bel... e o famigerado clichê: os dias foram melhores por estarmos juntos!

Aos colegas da turma de 2016/1 do PPGBiotec, pelos momentos compartilhados e divertidos que passamos juntos. Sucesso à todxs!

À Dra. Cecilia Veronica Nunez, por ter aceitado ser minha orientadora, dedicar-me tempo e compartilhar o seu conhecimento.

À UFAM, PPGBiotec, INPA e ao LTQPN pela oportunidade e todo o suporte e infraestrutura para execução desse trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro através da bolsa concedida.

A tudo e a todos que de alguma forma, direta ou indireta, ajudaram na elaboração dessa dissertação e/ou estiveram presentes nessa etapa da minha vida.

Gratidão... *sat nam!*

*Onde não queres nada, nada te falta.*

Caetano Veloso.

## RESUMO

A cultura de tecidos e células vegetais é uma estratégia eficiente para a produção segura e contínua de metabólitos secundários em condições físicas e químicas controladas. A *Duroia saccifera* (Roem. & Schult.) K. Schum, assim como outras espécies do gênero e da família Rubiaceae, é alvo potencial para estudos fitoquímicos e farmacológicos devido à ocorrência de uma grande variedade de classes de moléculas biologicamente ativas. Com base nisso, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de crescimento, a partir da determinação das curvas de crescimento, de culturas de calos e de suspensões celulares de *D. saccifera*, e realizar o estudo da composição química dos extratos obtidos dos calos e suspensões, bem como avaliar as atividades químicas e biológicas. Para isso, calos previamente estabelecidos *in vitro* em meio Murashige e Skoog suplementado com 4 mg.L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) e 2 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina (KIN) foram multiplicados em sucessivos subcultivos a cada 30 dias e mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 26 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16/8 horas (claro/escuro), providos por lâmpadas fluorescentes. O material foi extraído com os solventes orgânicos hexano, acetato de etila (AcOEt) e metanol. Os extratos foram testados nos ensaios antioxidante, antimicrobiano e antimicobacteriano, e fracionados. As culturas em suspensão celular foram estabelecidas a partir de 1 g de calos inoculados em 100 mL de meio de cultura líquido, em agitação contínua. Foram determinadas as curvas de crescimento de ambas as formas de cultivo, ao longo de 40 dias, com intuito de realizar um estudo comparativo através do cálculo dos parâmetros da cinética de crescimento. No estudo fitoquímico dos extratos foi possível verificar a presença de terpenoides, esteroides, substâncias aromáticas, ácidos graxos, entre outros metabólitos secundários. Na fração 2 (6,3 mg) do extrato hexânico foi observado o indício da presença do esteroide lupen-3-ona. Com relação aos ensaios biológicos e químicos, o extrato AcOEt apresentou alta atividade antimicobacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis*, com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 25 µg.mL<sup>-1</sup>, uma concentração inibitória a 90% (IC<sub>90</sub>) de 19,5 µg.mL<sup>-1</sup> e uma concentração bactericida mínima (CBM) de 200 µg.mL<sup>-1</sup>. Os extratos não foram ativos nos ensaios antimicrobianos frente às bactérias testadas, assim como os extratos não apresentaram potencial antioxidante frente ao radical livre DPPH e o complexo Fe<sup>3+</sup>/fenantrolina. Os resultados obtidos demonstraram que o calo seguiu um padrão de crescimento lento, atingindo maior massa fresca (MF) e seca (MS) no 40º dia de cultivo com concentração de 72,6 e 2,808 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Já para a suspensão celular, o acúmulo de biomassa e o crescimento da cultura de células foi expressivamente maior e mais rápido, atingindo maior MF e MS no 36º dia de cultivo, sendo de 413,7 e 12,995 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Não foi possível determinar com exatidão as fases estacionárias dos cultivos celulares, no entanto, foi inferido que a produção máxima de metabólitos secundários ocorreu no 40º dia para as culturas de calos e entre o 24º ao 36º dia para as culturas em suspensão. Os parâmetros cinéticos calculados demonstram que a suspensão celular possui um elevado potencial para o fornecimento de biomassa vegetal da espécie, tornando-se uma fonte promissora para a produção de metabólitos secundários obtidos *in vitro*.

**Palavras-chave:** cultura de tecidos de plantas, metabólitos secundários, biotecnologia, Rubiaceae.

## ABSTRACT

Tissue and plant cell culture is an efficient strategy for the safe and continuous production of secondary metabolites under controlled physical and chemical conditions. *Duroia saccifera* (Roem. & Schult.) K. Schum, as well as other species of the genus and the Rubiaceae family, is a potential target for phytochemical and pharmacological studies due to the occurrence of a wide variety of classes of biologically active molecules. Based on this, the objective of this work was to evaluate the growth potential, from the determination of the growth curves of the culture of calli and cell suspensions of the *D. saccifera* and to perform the phytochemical study of the extracts obtained from the callus and suspensions, and evaluate their chemical and biological activities. For this, calli previously established *in vitro* in Murashige and Skoog medium supplemented with 4 mg.L<sup>-1</sup> of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4D) and 2 mg.L<sup>-1</sup> kinetin (KIN) were multiplied in successive subcultures every 30 days and kept in a growth room with controlled temperature of 26 ± 2 °C, under photoperiod of 16/8 hours (light/dark), provided by fluorescent lamps. The material was extracted with the organic solvents hexane, ethyl acetate (EtOAc) and methanol. The extracts were tested in antioxidant, antimicrobial and antimycobacterial assays and fractionated. Suspension cell culture was established, when 1 g of callus was inoculated into 100 mL of the liquid culture medium. The growth curves of both forms of cultivation were determined during 40 days, in order to perform a comparative study through the calculation of growth kinetic parameters. In the phytochemical study of the extracts it was possible to verify the presence of terpenoids, steroids, aromatic substances, fatty acids, among others secondary metabolites. In fraction 2 (6.3 mg) of the hexane extract the evidence of the presence of the lupen-3-one steroid was observed. Regarding the biological and chemical assays, the EtOAc extract presented high antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, with minimal inhibitory concentration (MIC), 90% inhibitory concentration (IC<sub>90</sub>) and minimum bactericidal concentration (MBC) of 25, 19.5 and 200 µg.L<sup>-1</sup>, respectively. The extracts were not active in the antimicrobial assays against the tested bacteria, as the extracts had no antioxidant potential against the DPPH free radical and the Fe<sup>3+</sup>/phenanthroline complex. The results showed that the callus followed a slow growth pattern, reaching a higher fresh (FM) and dry mass (DM) on the 40<sup>th</sup> day, respectively, 72.6 and 2.808 g.L<sup>-1</sup>. The accumulation of biomass and the growth of suspension cell culture was significantly higher, reaching higher MF and MS, on the 36<sup>th</sup> day of cultivation, respectively of 413.7 and 12.995 g.L<sup>-1</sup>. It was not possible to determine the stationary stages in the growth, however, it was inferred that the maximum production of secondary metabolites occurred on the 40<sup>th</sup> day of the culture of callus and from the 24<sup>th</sup> to the 36<sup>th</sup> day in the culture of cell suspension. The calculated kinetic parameters demonstrate that the cell suspension has a high potential for the supply of plant biomass of the species, becoming a promising source for the *in vitro* secondary metabolites production.

**Keywords:** plant tissue culture, secondary metabolites, biotechnology, Rubiaceae.

## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

2,4 D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AcOEt	Acetato de etila
CA-LTQPN	Central Analítica - Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais
CBM	Concentração bactericida mínima
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
$\text{CDCl}_3$	Clorofórmio deuterado
$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$	Sulfato cérico
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCM	Diclorometano
$\text{DMSO-}d_6$	Dimetil sulfóxido deuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
FURG	Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande
$\text{IC}_{90}$	Concentração inibitória de 90% da população bacteriana
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
KIN	Cinetina
LABB	Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia
MeOH	Metanol
MS	Murashige e Skoog
NUPEMM	Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica
RMN	Ressonância magnética nuclear
UV	Ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação da curva de crescimento de células em suspensão, onde se relaciona a concentração de células (em gramas ou número de células) com o tempo de incubação das culturas (geralmente em dias). Fases: (A) lag, (B) exponencial, (C) linear, (D) desaceleração e (E) estacionária. ....27
- Figura 2.** Diversidade química e distribuição dos principais metabólitos secundários dentre as subfamílias de Rubiaceae. IXO: Ixoroideae, CIN: Cinchonoideae, RUB: Rubioideae (MARTINS e NUNEZ. 2015). ....30
- Figura 3.** Estruturas moleculares de alcaloides isolados da espécie *Duroia macrophylla*. ....33
- Figura 4.** Detalhes característicos de partes vegetativas de *Duroia saccifera*. ...34
- Figura 5.** Ilustração do par de domáceas conspicuas na base da folha da espécie *Duroia saccifera*. ....34
- Figura 6.** Calo friável de *Duroia saccifera* após 30 dias de cultivo *in vitro*. ....38
- Figura 7.** Calos de *Duroia saccifera* mantidos em frascos e em estantes na sala de crescimento durante a fase de multiplicação celular. ....39
- Figura 8.** Fluxograma geral da preparação dos extratos dos calos de *Duroia saccifera*. ....40
- Figura 9.** CCDC do extrato hexânico obtido dos calos *in vitro* da espécie *Duroia saccifera*. ....41
- Figura 10.** CCDC do extrato AcOEt e da fase AcOEt do extrato MeOH obtidos dos calos *in vitro* da espécie *Duroia saccifera*. ....41
- Figura 11.** CCDC das frações 1 a 5 da coluna do extrato hexano, eluída com hex/DCM 7:3. ....43
- Figura 12.** CCDC das frações 8 a 13 da coluna do extrato hexano, eluída com hex/DCM 3:7 e revelada com Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. ....44
- Figura 13.** CCDC das frações 26 a 30 da coluna do extrato hexano, eluída com hex/AcOEt 1:1. ....44
- Figura 14.** CCDC das frações 1 e 2 da coluna da fase AcOEt, eluídas com DCM 100%. ....46
- Figura 15.** CCDC da fração 3 da coluna da fase AcOEt, eluído com DCM/AcOEt 95:5. ....47

<b>Figura 16.</b>	CCDC da fração 4 da coluna da fase AcOEt, eluído com hex/AcOEt 6:4. ....	47
<b>Figura 17.</b>	CCDC das frações 1 (2,8 mg), 2 (1,3 mg) e 3 (6,8 mg) da coluna fração 2-3 da fase AcOEt, eluído com DCM 100%. ....	48
<b>Figura 18.</b>	CCDC das frações 4 (3,1 mg), 5 (1,6 mg) e 6 (6,4 mg) da coluna fração 2-3 da fase AcOEt, eluído com DCM/AcOEt 9:1. ....	48
<b>Figura 19.</b>	CCDC das frações 7(3,0 mg), 8 (2,2 mg) e 9 (0,9 mg) da coluna fração 2-3 da fase AcOEt, eluído com DCM/AcOEt 8:2. ....	49
<b>Figura 20.</b>	CCDC das frações 10 (3,4 mg) e 11 (0,8 mg) da coluna fração 2-3 da fase AcOEt, eluído com DCM/AcOEt 7:3 ....	49
<b>Figura 21.</b>	Fluxograma geral da obtenção dos extratos de calos <i>in vitro</i> de <i>Duroia saccifera</i> e os fracionamentos realizados. ....	50
<b>Figura 22.</b>	(A) e (B) Incubadora com agitador orbital a 120 rpm com erlenmeyer contendo células de calos de <i>Duroia saccifera</i> em meio MS líquido suplementado com 2,4D e KIN. (C) Bomba de vácuo para sucção de meio líquido. ....	54
<b>Figura 23.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato hexânico ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	60
<b>Figura 24.</b>	Expansões das regiões dos hidrogênios do extrato hexânico com os deslocamentos químicos. (A) Sinal em $\delta_{\text{H}}$ 9,76. (B) Região entre $\delta_{\text{H}}$ 8,3 a 6,0. (C) Região entre $\delta_{\text{H}}$ 6,0 a 3,5. (D) Região entre $\delta_{\text{H}}$ 2,39 e 1,55. (E) Região entre $\delta_{\text{H}}$ 1,0 e 0,68 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).. ....	60
<b>Figura 25.</b>	Espectro de RMN de $\text{H}^1$ do extrato AcOEt ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz). ....	61
<b>Figura 26.</b>	Expansões das regiões dos hidrogênios do extrato AcOEt. (A) Sinais em $\delta_{\text{H}}$ 10,57 e 9,90. (B) Região entre $\delta_{\text{H}}$ 7,50 e 6,20. (C) Região entre $\delta_{\text{H}}$ 5,15 e 2,94. (D) Dois H de (singletos) em $\delta_{\text{H}}$ 3,55 e 3,75. (E) Região entre $\delta_{\text{H}}$ 1,0 e 0,5 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz).....	62
<b>Figura 27.</b>	Espectro de RMN de $\text{H}^1$ da fase AcOEt ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz). ....	63
<b>Figura 28.</b>	Expansões das regiões dos hidrogênios da fase AcOEt. (A) Região de $\delta_{\text{H}}$ 8,29 e 6,5. (B) Região de $\delta_{\text{H}}$ 5,5 e 4,0. (C) Região de $\delta_{\text{H}}$ 3,8 e 2,75. (D) Região de $\delta_{\text{H}}$ 0,5 e 2,40 ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz).....	63
<b>Figura 29.</b>	Curva de crescimento de calos de <i>Duroia saccifera</i> expressa em massa fresca e seca. Dados representados com a média $\pm$ desvio padrão das triplicatas. ....	69

<b>Figura 30.</b>	Modelo matemático e curva obtidos pela aplicação do modelo estatístico de Gompertz para o crescimento dos calos de <i>D. saccifera</i> , em massa seca, ao longo de 40 dias de cultivo. ....	70
<b>Figura 31.</b>	Desenvolvimento de suspensões celulares de <i>Duroia saccifera</i> , durante 40 dias de cultivo.....	72
<b>Figura 32.</b>	Detalhes das suspensões celulares de <i>Duroia saccifera</i> , no 32º dia de cultivo. ....	73
<b>Figura 33.</b>	Detalhe da suspensão celular de <i>Duroia saccifera</i> , no 24º dia de cultivo.....	73
<b>Figura 34.</b>	Curva de crescimento de suspensões celulares de <i>D. saccifera</i> (massa fresca e seca).....	74
<b>Figura 35.</b>	Modelo matemático e curva obtidos pela aplicação do modelo estatístico de Gompertz para o crescimento da suspensão celular de <i>D. saccifera</i> , em massa seca, ao longo de 40 dias de cultivo.....	75
<b>Figura 36.</b>	Comparação das curvas de crescimento (em massa fresca) de calo e de suspensões celulares de <i>D. saccifera</i> , durante 40 dias de cultivo. .	78
<b>Figura 37.</b>	CCDC dos extratos hexânicos das amostras da curva de crescimento dos calos eluídos com DCM/MeOH 98:2. ....	83
<b>Figura 38.</b>	CCDC dos extratos acetato de etila das amostras da curva de crescimento das calos eluídos com AcOEt/MeOH 98:2. ....	84
<b>Figura 39.</b>	CCDC dos extratos hexânicos das amostras da curva de crescimento das suspensões celulares eluídos com DCM/MeOH 98:2. ....	85
<b>Figura 40.</b>	CCDC dos extratos acetato de etila das amostras da curva de crescimento das suspensões celulares eluídos com AcOEt/MeOH 95:5.....	86
<b>Figura 41.</b>	Espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos hexânico de culturas de calos (destacado em PRETO) e células em suspensão (destacado em VERMELHO), no tempo zero (destacado em AZUL) e ao longo de 40 dias de cultivo em meio de cultura semissólido e líquido. ....	88
<b>Figura 42.</b>	Espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos AcOEt de culturas de calos (destacado em PRETO) e células em suspensão (destacado em VERMELHO), no tempo zero (destacado em AZUL) e ao longo de 40 dias de cultivo em meio de cultura semissólido e líquido .....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Exemplos de atividades biológicas descritas por diferentes autores.....	22
<b>Tabela 2.</b>	Exemplos de atividades biológicas descritas por diferentes autores.....	25
<b>Tabela 3.</b>	Sistemas de eluição da coluna cromatográfica do extrato hexânico obtidos de calos de <i>Duroia saccifera</i> .....	42
<b>Tabela 4.</b>	Sistemas de eluição da coluna filtrante da fase AcOEt obtidos do extrato metanólico de calos <i>in vitro</i> da espécie <i>Duroia saccifera</i> . ....	46
<b>Tabela 5.</b>	Sistemas de eluição da coluna da fração 2-3 da fase AcOEt obtidos do extrato metanólico de calos <i>in vitro</i> da espécie <i>Duroia saccifera</i> . ....	48
<b>Tabela 6.</b>	Massas resultantes de calos obtidos <i>in vitro</i> da espécie <i>Duroia saccifera</i> . ....	57
<b>Tabela 7.</b>	Massas e rendimentos dos extratos e fases obtidos dos calos de <i>Duroia saccifera</i> . ....	58
<b>Tabela 8.</b>	Resultados dos ensaios de atividade antioxidante frente ao DPPH e o e ao complexo Fe <sup>3+</sup> /fenantrolina, dos extratos, ± desvio padrão.....	65
<b>Tabela 9.</b>	Determinação da CIM, IC <sub>90</sub> e CBM dos extratos AcOEt e MeOH e dois controles (antibióticos) frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . ....	66
<b>Tabela 10.</b>	Comparação dos parâmetros cinéticos entre a cultura de calos e células em suspensão. ....	79
<b>Tabela 11.</b>	Taxas máximas de crescimento específico e índice de crescimento de cultura de células em suspensão de diferentes espécies, relatados na literatura. (adaptado de Nova-López <i>et al.</i> , 2017). ....	79
<b>Tabela 12.</b>	Massa e rendimento dos extratos hexano e acetato de etila obtidos das amostras referente ao crescimento da cultura de calos de <i>D. saccifera</i> em meio semissólido.....	81
<b>Tabela 13.</b>	Massa e rendimento dos extratos hexano e acetato de etila obtidos das amostras referente ao crescimento da cultura de células em suspensão de <i>D. saccifera</i> em meio líquido. ....	82

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
2.1	PRODUTOS NATURAIS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	20
2.2	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	21
2.3	CULTURA DE CÉLULAS E TECIDOS VEGETAIS PARA A OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	22
2.3.1	OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM SUSPENSÃO CELULAR.....	24
2.3.2	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE CULTURAS DE CALOS E SUSPENSÃO CELULAR .....	26
2.3.3	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO DE CULTURAS DE CALOS E SUSPENSÃO CELULAR .....	28
2.4	FAMÍLIA RUBIACEAE .....	29
2.5	GÊNERO DUROIA.....	31
2.6	<i>DUROIA SACCIFERA</i> .....	33
3.	OBJETIVOS.....	37
3.1	OBJETIVO GERAL .....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	38
4.1	MATERIAL VEGETAL ESTABELECIDO EM CULTURAS IN VITRO .....	38
4.2	MULTIPLICAÇÃO DE CALOS IN VITRO .....	39
4.3	ESTUDO FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS DOS CALOS IN VITRO .....	39
4.3.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL PARA O ESTUDO QUÍMICO....	39
4.3.2	PREPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS.....	40
4.3.3	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES .....	40
4.3.4	FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DOS CALOS .....	42
4.3.4.1	COLUNA CROMATOGRÁFICA ABERTA DO EXTRATO HEXANO .	42
4.3.4.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	44
4.3.5	FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO DOS CALOS .....	45
4.3.5.1	PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	45

4.3.5.2 COLUNA CROMATOGRÁFICA FILTRANTE DA FASE ACETATO DE ETILA DO EXTRATO METANÓLICO .....	46
4.3.5.3 COLUNA CROMATOGRÁFICA ABERTA DA FRAÇÃO F2-3 .....	47
4.3.6 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE <sup>1</sup> H .....	51
4.3.7 ENSAIOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS.....	51
4.3.7.1 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	51
4.3.7.2 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIMICOBACTERIANA.....	52
4.4 ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE CALOS E CÉLULAS EM SUSPENSÃO CELULAR E ANÁLISE DE SEUS METABÓLITOS.....	53
4.4.1 CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS FRIÁVEIS .....	53
4.4.2 ESTABELECIMENTO E CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO .....	54
4.4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	54
4.4.4 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CALOS E CÉLULAS EM SUSPENSÃO .....	55
4.4.4.1 PREPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS .....	55
4.4.4.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA PARA ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA.....	55
4.4.4.3 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E FASES .....	57
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	65
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIMICOBACTERIANA....	65
5.4 ESTABELECIMENTO E ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS .....	67
5.4.1 AVALIAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS CALOS FRIÁVEIS .	68
5.4.2 AVALIAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DA SUSPENSÃO CELULAR.....	71

5.4.3 COMPARAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO ENTRE AS CULTURAS DE CALO E SUSPENSÃO CELULAR .....	77
5.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CULTURA DE CALOS E CÉLULAS EM SUSPENSÃO.....	80
6. CONCLUSÃO GERAL.....	900
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por produtos de origem natural, principalmente os de origem vegetal, se deve ao fato de que as plantas produzem e acumulam, em pequenas quantidades a partir do seu metabolismo, substâncias químicas orgânicas (tais como alcaloides, terpenoides, substâncias aromáticas - flavonoides, entre outras), e que apresentam atividades biológicas comprovadas e significativas (SIMÕES *et al.*, 2017). Com isso, estudos científicos que visam a obtenção de substâncias biologicamente ativas de interesse econômico tornaram-se uma ferramenta para otimizar a busca e o desenvolvimento de novos produtos, com aplicação medicinal, alimentícia, agrônômica, entre outras (ENRIQUEZ, 2009; ISAH, 2016; FRANÇA, 2017).

Dentro deste contexto, a flora brasileira destaca-se, pois, a grande extensão territorial do Brasil e as condições climáticas diversas fazem com que a flora possua uma rica biodiversidade, com inúmeras espécies vegetais consideradas importantes para a obtenção e produção de produtos de interesse (PEREIRA E CARDOSO, 2012). Destacando-se dentro da flora brasileira, a floresta amazônica abriga grande parte dessa diversidade e possui centenas de espécies pertencentes a diferentes famílias. Dentre elas, destaca-se a família Rubiaceae com grande representatividade na flora brasileira. Estudos fitoquímicos e farmacológicos com plantas da família Rubiaceae ressaltam a ocorrência de uma grande variedade de classes de metabólitos, tais como alcaloides, esteroides, terpenos, flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos e glicosídeos variados (MARTINS E NUNEZ, 2015).

Dentre os gêneros de grande potencial, destaca-se o gênero *Duroia*. Segundo Nunez e colaboradores (2009; 2012) é relatado o grande potencial da espécie *Duroia macrophylla*, de onde foram isolados os alcaloides indólicos raunitidina, 9-metoxi-ajmalicina e 10-metoxi-ajmalicina (cabucina). Além disso, Martins e colaboradores (2013; 2014) relataram a presença de outras substâncias, como os triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico e substâncias aromáticas (fenóis e flavonoides). Esses estudos relatam que algumas dessas substâncias apresentaram atividades biológicas significativas em ensaios de atividade antitumoral, antioxidante, antibacteriana e/ou antimicobacteriana.

Outra espécie com grande potencial químico e farmacológico é a espécie *Duroia saccifera*. Em estudos fitoquímicos prévios com a espécie, Mesquita e colaboradores (2015) observaram a presença de triterpenoides no extrato metanólico das folhas, onde o mesmo não apresentou toxicidade frente à *Artemia salina* e propriedades antioxidantes. Contreras-Mejia (2017) relatou a identificação do flavonoide 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona e indícios da presença de alcaloides, sendo um deles derivado da quinolina, no qual foi proposta a sua estrutura molecular inédita na literatura, ainda sob validação. Em estudo de propagação vegetativa de calos *in vitro* da espécie, observaram indícios da presença de terpenos e esteroides no extrato hexânico obtido dos calos, com atividades biológicas significativas (SOUZA, 2016).

Com base na quimiotaxonomia, a ocorrência de alguns produtos do metabolismo secundário das plantas pode ser restrita a determinados grupos, associando a composição química das plantas à taxonomia (GIBBS, 1963; YOUNG *et al.*, 1996). A presença de certos metabólitos secundários indica claramente que as espécies que os sintetizam possuem uma rota biossintética específica e um gene ou conjunto de genes correspondentes (POSER, 2017). Sendo assim, as espécies pertencentes a um grupo de plantas, como é o caso do gênero *Duroia* e a família Rubiaceae, podem possuir um potencial fitoquímico e biológico relacionados.

Uma ferramenta para a obtenção de metabólitos secundários (além de outras finalidades) é a partir da biotecnologia vegetal que fornece uma abordagem alternativa para a utilização de plantas ou parte delas (ZHONG *et al.*, 1994). As técnicas buscam utilizar de maneira sustentável os produtos de origem natural, através de estratégias para a conservação da biodiversidade e evitando as consequências ambientais preocupantes geradas pela exploração excessiva de espécies de interesse, como a coleta predatória e indiscriminada das plantas em seu habitat (AZEVEDO, 2003a). Além disso, a biotecnologia vegetal vem sendo empregada como um método eficiente quando se trata de produção de plantas e/ou biomassa vegetal em grande quantidade e com qualidade fitossanitária satisfatória (FUMAGALI *et al.*, 2008).

A cultura de células e tecidos de plantas *in vitro*, dentro da área da biotecnologia vegetal, surgiu como um sistema alternativo seguro, de qualidade e

confiabilidade para a produção e acúmulo de substâncias bioativas valiosas. Além disso, pode proporcionar vários benefícios, como minimizar problemas nas etapas de produção, permitindo que seja uma produção contínua, confiável e teoricamente previsível de substâncias, independentemente de variações sazonais e ambientais, bem como a otimização e o aprimoramento de sua biossíntese sob condições ambientais e físicas controladas (DAVIES E DEROLETS, 2014).

Levando em consideração as evidências de que as plantas do gênero *Duroia* possuem metabólitos secundários de interesse e que a obtenção dos calos da espécie *Duroia saccifera* foi realizada anteriormente por Souza (2016), o presente trabalho teve como objetivo dar continuidade ao estudo fitoquímico dos extratos obtidos dos calos, a fim de identificar as classes químicas presentes. Além disso, este trabalho buscou desenvolver o estudo da cinética de crescimento de células em suspensão, a fim de obter uma metodologia para posteriores trabalhos de indução e identificação de substâncias com potencial químico e biológico significativos, a partir da técnica de cultura de tecidos vegetais.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PRODUTOS NATURAIS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas possuem a capacidade de produzir uma grande diversidade de moléculas orgânicas, geralmente de estrutura complexa. Dentre elas incluem-se os metabólitos secundários, que são substâncias que não estão diretamente envolvidas no metabolismo básico como os metabólitos primários (associados, por exemplo, ao crescimento, desenvolvimento, respiração, fotossíntese) e são produzidas em baixas concentrações nas plantas, com baixo peso molecular e atividades biológicas marcantes (CROTEAU *et al.*, 2000; BERG E LUBERT, 2008).

Todos os organismos vegetais usam os mesmos tipos de metabólitos primários, porém produzem diferentes classes de metabólitos secundários. Essas substâncias são empregadas na proteção da planta contra agentes patogênicos e herbívoros e contra estresses ambientais, como o excesso de raios ultravioleta. Além da função protetora, também são usados para atrair polinizadores e dispersores de sementes (PEIXOTO NETO E CAETANO, 2005; TAIZ E ZEIGER, 2013).

Segundo Cheng (2017) a síntese desses metabólitos é resultado de diversas reações bioquímicas e existem diferentes formas de organizar os metabólitos de plantas: pela função biológica, estrutura química e pelas vias biossintéticas. São descritas três vias biossintéticas principais: (1) a via do ácido chiquímico, que leva à síntese de fenilpropanoides, como taninos, cumarinas flavonoides e (2) a via do ácido mevalônico, precursor dos terpenoides e esteroides (3) a via do acetato, levando a síntese de ácidos graxos. Os metabólitos secundários podem ser classificados em três grupos principais: terpenoides (como voláteis de plantas, carotenoides e esteroides), substâncias fenólicas (como ácidos fenólicos, cumarinas, lignanas, estilbenos, flavonoides, taninos e lignina) e substâncias que contenham nitrogênio, tais como os alcaloides.

Pelo fato de possuírem uma extensa gama de atividades biológicas em resposta aos estímulos do meio ambiente, essas substâncias químicas produzidas pelas plantas despertam grande interesse do ponto de vista comercial, principalmente na área farmacêutica, além das indústrias química, agrícola, alimentícia, agronômica, cosmética e outras (SIMÕES *et al.*, 2017). As plantas que

possuem essas substâncias vêm sendo utilizadas há séculos na medicina popular e nos dias atuais, como medicamentos, cosméticos e matéria prima para diversos fins (NEWMAN E CRAGG, 2016).

## 2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Produtos naturais têm uma longa e bem-sucedida história nos processos de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Plantas, insetos, microrganismos e organismos marinhos produzem metabólitos secundários para a própria sobrevivência, visto que exibem complexas interações com o meio ambiente e contra agentes patogênicos. Como consequência do papel biológico para os organismos produtores, esses metabólitos podem exibir amplo espectro de aplicação biológica (PUPO *et al.*, 2006). Diversos autores citam a ação terapêutica e/ou contra agentes patogênicos promovida por moléculas bioativas isoladas a partir de plantas inteiras ou partes da mesma. Esses metabólitos secundários podem ser avaliados em um amplo espectro de atividades biológicas (CARTER E ANDEL, 2011).

Um dos exemplos de aplicação terapêutica, utilizados na medicina atual, são os fármacos extraídos da espécie *Catharanthus roseus*, conhecida popularmente como “vinca”, sendo eles a vincristina e vimblastina. Esses alcaloides apresentam atividades antitumorais, sendo a vincristina utilizada no tratamento de leucemia infantil e a vimblastina no tratamento do câncer de testículo. Seus derivados semi-sintéticos vinorelbina e vindesina são utilizados no tratamento de câncer de pulmão e leucemia, respectivamente (SIMÕES *et al.*, 2017). Além da atividade citotóxica da espécie *C. roseus* mencionada anteriormente, várias atividades biológicas podem ser atribuídas as plantas e consequentemente à(s) molécula(s) presente(s) nas plantas. Na tabela 1 são citadas algumas dessas atividades.

**Tabela 1.** Exemplos de atividades biológicas descritas por diferentes autores.

<b>Atividade biológica</b>	<b>Espécies estudadas</b>	<b>Referência</b>
Antimicrobiana contra infecções causadas por bactérias e fungos	Espécies de <i>Piper</i>	ALVES <i>et al.</i> , 2016
Antiviral	<i>Theobroma cacao</i> , <i>Artocarpus integrifolia</i> , <i>Vaccinium macrocarpon</i> , entre outras	GANDHI <i>et al.</i> , 2016
Antiparasitária	<i>Musa paradisiaca</i>	ROMERO-BENAVIDES <i>et al.</i> , 2017
Antiinflamatória e analgésica	<i>Cicer arietinum</i> , <i>Cistanche tubulosa</i> , <i>Cressa cretica</i> , entre outras	AL-SNAFI, 2016
Larvicida	<i>Aloe vera</i> L.	SPRENGER, 2015
Inseticida	<i>Nepeta leavigata</i> , <i>N. kurramensis</i> e <i>Rhynchosia reniforme</i>	AHMAD <i>et al.</i> , 2016

### 2.3 CULTURA DE CÉLULAS E TECIDOS VEGETAIS PARA A OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Com a crescente demanda por produtos de origem natural, contrapondo-se à perda de populações vegetais, da diversidade genética, a degradação do meio ambiente e extinção de espécies, a cultura de tecidos, células e órgãos vegetais *in vitro* tem se mostrado como uma ferramenta biotecnológica importante para a produção em larga escala de plântulas e/ou biomassa vegetal em condições controladas, para diversificados fins, ressaltando principalmente a indústria agrônômica, farmacêutica e de produtos naturais (TOSO E MELANDRI, 2011).

Além disso, nas plantas *in vivo* ocorrem limitações na produção de metabólitos secundários de interesse, visto que esses são produzidos em baixa quantidade e geralmente são de difícil extração, além da impossibilidade de produção em qualquer época do ano, em razão das variações das condições

ambientais como temperatura, nutrição do solo, infestações e sazonalidade (HOSTETTMANN *et al.*, 2003; FUMAGALI *et al.*, 2008).

Desta forma, a obtenção de biomassa vegetal para a produção de metabólitos secundários *in vitro* é uma ferramenta que vem sendo empregada como alternativa de produção segura e contínua, com qualidade fitossanitária e genética, padrão uniforme e alta velocidade de produção. Sendo assim, é possível controlar os fatores químicos (composição do meio de cultura, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, pH, reguladores de crescimento), biológicos (tipos e condição fisiológica dos explantes, características genéticas) e físicos (temperatura, luminosidade, fotoperíodo) (GORELICK E BERNSTEIN, 2014).

A obtenção de biomassa vegetal é resultado da formação de calos a partir de explantes, onde o calo é uma massa de células pouco ou completamente indiferenciadas e não organizadas. São obtidos a partir da cultura *in vitro* de fragmentos de tecidos ou órgãos vegetais isolados da planta-mãe, chamado de explantes, cultivados em meio de cultura contendo reguladores de crescimento. Esta capacidade é baseada na totipotência celular, que é caracterizada como “a capacidade de uma célula vegetal diferenciada de ser induzida a voltar ao estado meristemático, podendo redefinir seu padrão de diferenciação celular e desenvolver tecidos, órgãos e até mesmo indivíduos inteiros” (TORRES *et al.*, 2000; TERMIGNONI, 2005).

A produção de metabólitos secundários através das técnicas de cultura de células e tecidos vegetais é uma metodologia que vem sendo desenvolvida nos últimos anos, abrindo novas possibilidades para a obtenção de metabólitos de forma e fontes alternativas (RAO E RAVISHANKAR, 2002; ISAH *et al.*, 2018). Diferentes substâncias com atividades biológicas vêm sendo encontradas em culturas *in vitro*, como, por exemplo, flavonoides e os estilbenos da espécie *Artocarpus lakoocha* (MANEECHAI *et al.*, 2012), esteroides da espécie *Pyrostegia venusta* (LOREDO-CARRILLO *et al.*, 2013), ácidos fenólicos das espécies *Byrsonima verbascifolia* e *Lactuca aculeata* (CASTRO *et al.*, 2016; STOJAKOWSKA E MALARZ, 2017), antraquinonas de *Gynochthodes umbellata* (ANJUSHA E GANGAPRASAD, 2017), alcaloides de *Ophiorrhiza mungos* (DEEPTHI E SATHEESHKUMAR, 2016) e terpenos de espécies do gênero *Daucus* sp. (JAWDAT *et al.*, 2016).

Para cultura de tecidos *in vitro*, a fitoquímica tem papel fundamental na detecção e análise de produtos do metabolismo vegetal. O estudo da constituição química das plantas tem sido facilitado pelo desenvolvimento de métodos rápidos e precisos, tanto para a identificação das classes de metabólitos quanto para a detecção de substâncias específicas (PILATTI *et al.*, 2010). Estudos atuais revelam que é possível a produção de calos *in vitro* de forma eficiente para a produção de substâncias de interesse (COSTA *et al.*, 2012; ANJUSHA E GANGAPRASAD, 2017).

### 2.3.1 OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM SUSPENSÃO CELULAR

Outra alternativa para a produção de substâncias *in vitro* é a partir da cultura de células vegetais em suspensão. Uma cultura em suspensão é feita por meio da transferência de uma quantidade de calo estabelecido *in vitro*, em meio semissólido, para um meio líquido, onde é mantida sob condições adequadas de aeração, agitação, luz, temperatura entre outros parâmetros (CUSIDO *et al.*, 2014).

A partir da cultura de calos friáveis *in vitro*, é possível estabelecer com maior facilidade suspensões celulares, que possuem vantagem como a velocidade de multiplicação, o fornecimento de uma fonte contínua de biomassa, melhores condições para manipulação da cultura, dentre outros (SZABADOS, MROGINSKI, ROCA, 1991). Outra vantagem inclui a possibilidade de induzir a produção de metabólitos secundários utilizando elicitores bióticos e/ou abióticos (CUSIDO *et al.*, 2014). Além disso, o escalonamento das culturas, com o uso de biorreatores, pode ser feito a fim de maximizar a produção de biomassa e metabólitos secundários de interesse (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2016).

Diversos estudos têm relatado a obtenção de metabólitos secundários a partir de cultura de células em suspensão, principalmente com atividades biológicas significativas (MUSTAFA *et al.*, 2011). A produção de diferentes classes de metabólitos pode ser obtida quando se estabelece uma cultura de células *in vitro* de espécies com potencial químico e/ou biológico. Alcaloides, terpenos, flavonoides, entre outros grupos químicos já foram isolados e identificados (WILSON e ROBERTS, 2012, VASILEV *et al.* 2013; HE *et al.*, 2015). Na tabela 2 estão

mostrados alguns metabólitos produzidos em cultura de tecidos *in vitro* de espécies da família Rubiaceae com atividades biológicas relevantes.

**Tabela 2.** Exemplos de atividades biológicas descritas por diferentes autores

<b>Espécies estudadas</b>	<b>Tipo de cultura</b>	<b>Metabólito(s) isolado(s)</b>	<b>Atividade(s) biológica(s)</b>	<b>Referência</b>
<i>Anthocephalus indicus</i>	Calos	Flavonoides	antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória	INDU <i>et al.</i> , 2013
<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Suspensão celular e de raízes	Alcaloides (emetina e cefalina)	Antiemética, expectorante	JHA <i>et al.</i> , 1991
<i>Rubia cordifolia</i>	Suspensão celular	Antraquinonas (purpurina e molugina)	Antimicrobiana, antiviral, antitumoral	FAN <i>et al.</i> , 2013
<i>Uncaria tomentosa</i>	Suspensão celular	Esteroides, ác. ursólico e oleanólico		FLORES-SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2002
<i>Rubia tinctorum</i>	Raízes adventícias	Antraquinonas (alizarina e purpurina)	Bactericida e antifúngico	BÁNYAI <i>et al.</i> , 2006

Embora a produção de metabólitos secundários por técnicas de cultura de células e tecidos vegetais seja uma abordagem alternativa para maior produtividade e menor utilização de plantas *in natura*, ainda são enfrentadas muitas limitações na produção. A suspensão celular é uma técnica que possibilita o aumento da biomassa vegetal devido às condições de cultivo. Já para melhorar os rendimentos de metabólitos obtidos de culturas *in vitro* vem sendo desenvolvido o uso de elicitores bióticos e/ou abióticos, como por exemplo uso de extratos fúngicos, jasmonato de metila, íons metálicos, luz ultravioleta, salinidade, temperatura, entre outros. A elicitação tem estimulado a biossíntese de substâncias de interesse provenientes do metabolismo secundário, aprimorando e melhorando cada vez mais a cultura de tecidos vegetais para obtenção de substâncias (ZHAO, DAVIS, VERPOORTE, 2007; WANG *et al.*, 2017).

### 2.3.2 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE CULTURAS DE CALOS E SUSPENSÃO CELULAR

A aplicação da cultura de células e tecidos de plantas é uma alternativa para o fornecimento de substâncias químicas com potencial farmacológico e biotecnológico, visto que a extração a partir de populações nativas pode gerar diversos problemas como, por exemplo, a extinção de espécies vegetais e degradação de ambientes naturais (ISAH, 2016). A partir da cultura de células de plantas em suspensão é possível estabelecer um sistema de indução, extração e purificação de moléculas de maneira contínua e satisfatória.

É importante mensurar os parâmetros relacionados ao crescimento para assegurar a reprodutibilidade da produção, seja para experimentos em escala laboratorial como para industrial. No entanto, não existe um padrão uniforme e claro de crescimento de culturas de células vegetais (MUSTAFA *et al.*, 2011). Isto porque os estágios de crescimento vão depender de diversos fatores como a espécie e/ou genótipo selecionado, o explante utilizado, o meio de cultura e o regime de subcultura. Assim, o calo e as células em suspensão devem ser avaliados quanto à velocidade de seu crescimento, bem como as concentrações intracelulares e extracelulares dos metabólitos (FUMAGALI *et al.*, 2008).

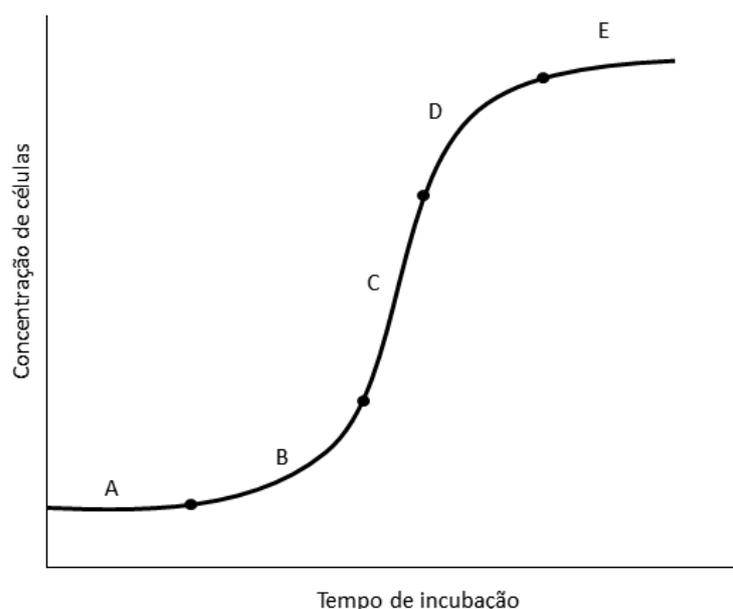
As curvas de crescimento, tanto do calo quanto da suspensão celular, são importantes para identificar os estágios de crescimento, permitindo inferir o intervalo ideal para o subcultivo para um novo meio de cultura ou para a sua utilização em suspensões celulares, visando à produção de metabólitos secundários. Em ambos os casos, o que define é o estágio de crescimento da cultura que se está manipulando (MUSTAFA *et al.*, 2011).

Para determinar a curva de crescimento e desenvolvimento de células *in vitro* pode ser usado, por exemplo, o critério de acúmulo de massa ou o número de células por volume de suspensão (DIXON, 1985). Normalmente, a curva de crescimento de uma cultura de suspensão celular tem uma forma característica (Figura 1) consistindo em cinco estágios fundamentais (GEORGE *et al.*, 2008):

- a) lag, na qual há o pequeno acúmulo de biomassa e multiplicação celular;

- b) exponencial (ou log), na qual ocorre a máxima taxa de divisão celular de forma constante, onde há o aumento de biomassa por unidade de concentração;
- c) linear, na qual há a diminuição da taxa de divisão celular e aumento do volume;
- d) desaceleração, na qual ocorre o declínio da taxa de crescimento;
- e) estacionária, na qual o processo de divisão celular (e consequentemente o número de células) e o acúmulo de biomassa são cessados.
- f) senescência ou morte celular.

**Figura 1.** Representação da curva de crescimento de células em suspensão, onde se relaciona a concentração de células (em gramas ou número de células) com o tempo de incubação das culturas (geralmente em dias). Fases: (A) lag, (B) exponencial, (C) linear, (D) desaceleração e (E) estacionária.



O estudo da cinética fornece uma visão sobre a dinâmica dos sistemas de cultura celular, bem como as interações entre as células e seus ambientes circundantes. O crescimento celular em um sistema é limitado à disponibilidade de nutrientes essenciais e/ou a acumulação de produtos tóxicos. Essa interação pode ser avaliada para construir um perfil de crescimento celular, que pode então ser subdividido nas fases já mencionadas. A melhor compreensão dessa dinâmica, bem

como a determinação de importantes valores dos parâmetros cinéticos, facilita tanto a otimização quanto o escalonamento dos bioprocessos (OMAR, 2006).

### 2.3.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO DE CULTURAS DE CALOS E SUSPENSÃO CELULAR

A avaliação da cinética de crescimento é frequentemente estudada levando em consideração os principais modelos matemáticos de crescimento e, frequentemente, é utilizado o modelo matemático sigmoide de Gompertz. Em 1825, Benjamin Gompertz propôs uma função que expressava a taxa de mortalidade de seres humanos. Após alguns anos, o modelo de Gompertz começou a ser utilizado por diversos autores como uma curva de crescimento, tanto para descrições econômicas quanto para fenômenos biológicos (WINSOR, 1931).

A partir da determinação das constantes da equação, é possível calcular os parâmetros cinéticos referentes ao crescimento celular, que são a taxa de crescimento específico máxima ( $\mu_{max}$ ), o tempo de latência ( $\lambda$ ) e o tempo de regeneração das células (G), medidos em  $\text{dia}^{-1}$ , dia e dia, respectivamente. A seguir, é descrita a equação de Gompertz e o significado de cada parâmetro a serem calculados:

$$Y(t) = a * e^{(-b * e^{(-c * t)})}$$

onde,

Y é o valor variável depende, calculado pelo  $\log(N_f/N_i)$ , sendo N a massa inicial e  $N_f$  a massa final (em gramas),

t é o tempo (em dias),

a, b e c são constantes de integração, onde a é a massa assintótica ou máxima, onde  $b = (\mu_{max} * e)/a$  e  $c = (\mu_{max} * e * \lambda)/a + 1$ ,

e é a exponencial de 1 ( $e = \exp(1)$ ),

$\mu_{max}$  corresponde à velocidade máxima de crescimento das células e é calculado por  $\mu_{max} = a * c$ ,

$\lambda$  é o período em que não há multiplicação celular após a inoculação (fase lag) e é calculado por  $\lambda = (b - 1)/c$ ,

G é o tempo para geração ou duplicação das células e é calculado a  $G = \ln(2)/\mu_{\max}$ .

Além disso, o cálculo do índice de crescimento (IC) pode ser feito para determinar a variação da massa por unidade de tempo. De acordo com Ketchum *et al.* (1995) a equação para calcular o IC é:

$$IC = \frac{PSf - PSi}{PSi}$$

onde,

IC é o índice de crescimento celular ao longo do tempo de cultivo (%),

PSf é o peso seco final e

PSi é o peso seco inicial.

## 2.4 FAMÍLIA RUBIACEAE

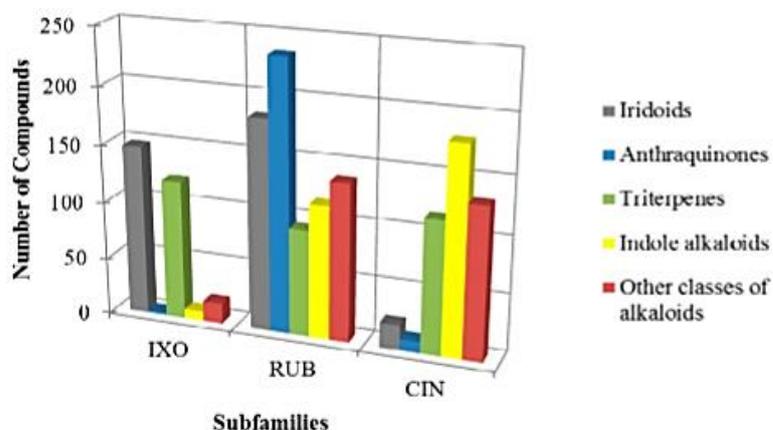
A família Rubiaceae é considerada a quarta maior família dentre as Angiospermas em número de espécies, depois de Orchidaceae, Asteraceae e Fabaceae. É composta por 13.673 espécies em 609 gêneros (THE PLANT LIST, 2018). Apresenta distribuição cosmopolita, embora seu centro de diversidade esteja na região neotropical, especialmente nas florestas úmidas de baixa altitude, onde se estima que existam cerca de 5.000 espécies (DELPRETE, 2004). No Brasil, a família Rubiaceae está representada por 112 gêneros e 1.347 espécies, concentradas principalmente na floresta Amazônica, Mata Atlântica e no Cerrado (BARBOSA *et al.*, 2017), e estão representadas por ervas, arbustos, subarbustos, árvores e raramente lianas (SOUZA E LORENZI, 2008).

Bremer (2009), a partir de um estudo filogenético, sugeriu a divisão da família Rubiaceae em três subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae, com 44 tribos. Essa última classificação foi utilizada por Delprete e Jardim (2012) como base para a discussão dos grupos taxonômicos de Rubiaceae Juss. no Brasil, sendo essa forma de classificação adotada no presente trabalho.

Cada uma das subfamílias de Rubiaceae apresenta um perfil químico típico para iridoides (Ixoroideae), alcaloides indólicos (Cinchonoideae) e antraquinonas

(Rubioidae), que são considerados marcadores quimiotaxonômicos de Rubiaceae. Entretanto, na anteriormente dita como subfamília Antirheoideae, não foi observada uma ocorrência padronizada de nenhum desses marcadores químicos, sendo considerada apenas as informações morfológicas (BOLZANI *et al.*, 2001). Na figura 2 é possível observar a distribuição dos principais metabólitos secundários dentre as subfamílias de Rubiaceae.

**Figura 2.** Diversidade química e distribuição dos principais metabólitos secundários dentre as subfamílias de Rubiaceae. IXO: Ixoroideae, CIN: Cinchonoideae, RUB: Rubioideae (MARTINS e NUNEZ. 2015).



Em um estudo para avaliação do perfil quimiotaxonômico da família, verificou-se a presença de iridoides glicosilados em várias espécies, a partir do qual se pode concluir que estes metabólitos, possivelmente, estão presentes em praticamente todas as subfamílias de Rubiaceae (HIROYUKI *et al.*, 1988). A família Rubiaceae possui espécies de grande importância farmacológica e econômica, devido à ocorrência de uma grande variedade de classes de metabólitos já encontradas, tais como alcaloides, esteroides, terpenos, flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos e glicosídeos variados (MARTINS E NUNEZ, 2015).

Por isso, muitas destas plantas são empregadas de diferentes formas nas indústrias farmacêutica e alimentícia, além de serem usadas como ornamentais, entre outras finalidades. Exemplos destes metabólitos conhecidos são: cafeína (*Coffea arabica*); emetina (*Cephaelis ipecacuanha*) com atividade anti-emética e anti-helmíntica; quinidina (*Cephaelis ledgeriana*) usada como antiarrítmico; quinina (*Cinchona pubescens*) empregado no tratamento da malária e a ioimbina

(*Pausinystalia yoimba*) usada como afrodisíaco (CORDELL *et al.* 2001; RIZZINI E MORS, 1995).

Um exemplo sobre a bioatividade de metabólitos encontrados nas plantas da família Rubiaceae pode ser observada com a espécie *Psychotria viridis*, mais conhecida como chacrona. É utilizada em cerimônias e rituais religiosos, em associação com o cipó *Banisteriopsis caapi* (Spruce) Morton (“caapi”), uma Malpighiaceae, no preparo de uma bebida com propriedades alucinógenas, referente à presença de alcaloides *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) (CALLAWAY *et al.*, 1996; GROB *et al.*, 1996). Outro exemplo notado são as propriedades da espécie *Genipa americana*, conhecida popularmente como genipapo, onde foi isolado a genipina, um iridoide incolor que quando entra em contato com a pele tem propriedade corante natural, e além disso pode ser utilizado no preparo de sucos e doces (PINTO, 1995; RIZZINI E MORS, 1995).

A espécie *Uncaria tomentosa*, chamada popularmente de “unha-de-gato”, tem sido amplamente empregada na medicina popular. Dentre as substâncias isoladas desta planta, foi observada uma ação imunoestimulante dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos, assim como uma inibição do crescimento de células leucêmicas. Outros grupos de substâncias estudados são os glicosídeos do ácido quinóico, triterpenos oxigenados e procianidina, no qual demonstraram a atividade antiinflamatória desta planta, através da inibição da enzima fosfolipase A2 (PERAZZO, 2004; GONÇALVES, DINIS E BATISTA, 2005).

A partir da investigação fitoquímica é possível detectar a presença de substâncias que podem apresentar atividades biológicas significativas. Já foram comprovadas diversas atividades farmacológicas a partir de substâncias obtidas de espécies de Rubiaceae como: antidiarreica, anticancerígena, antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante, analgésica, entre outras (CORDELL, QUINN-BEATTIE E FARNSWORTH, 2001; TAKAYAMA, 2004; HEITZMAN *et al.*, 2005).

## 2.5 GÊNERO *DUROIA*

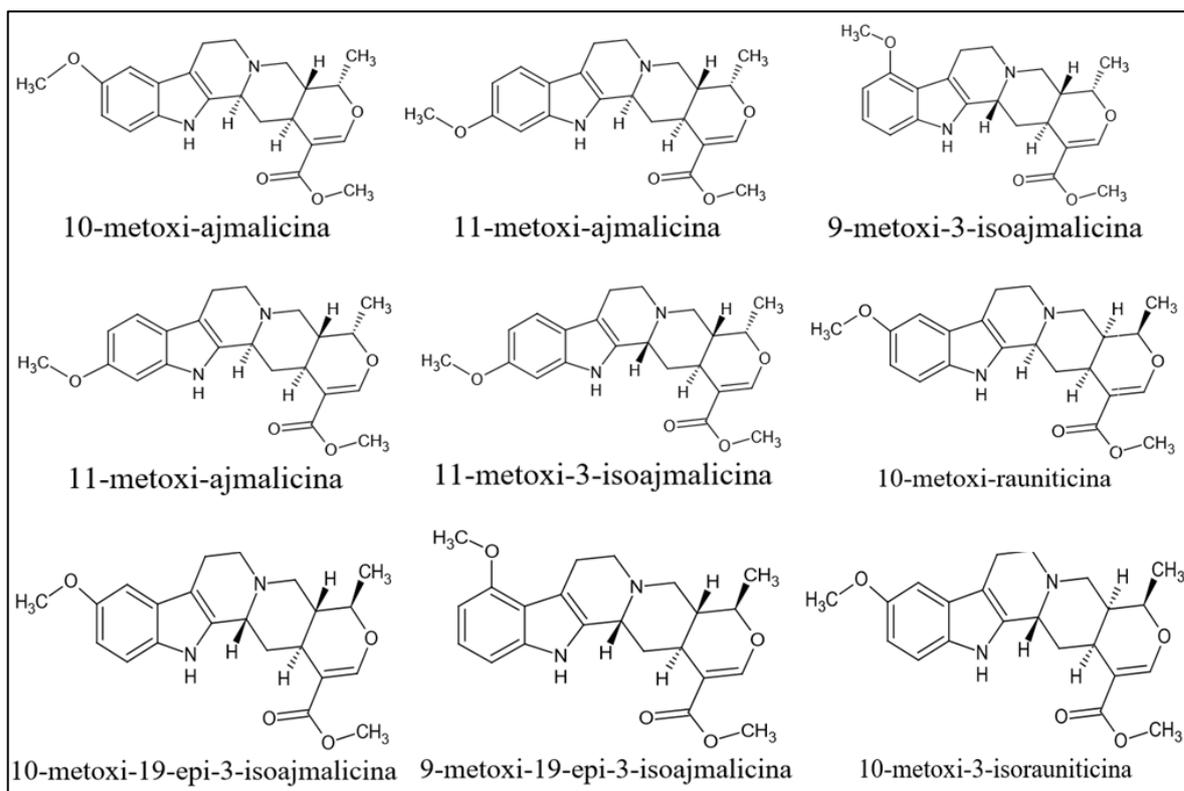
O gênero *Duroia*, pertencente à subfamília Ixoroideae, contém 38 espécies e apresenta distribuição neotropical, sendo localizada na Costa Rica e na América do

Sul (TAYLOR *et al.*, 2004; THE PLANT LIST, 2018). Poucos estudos são encontrados na literatura para o gênero *Duroia*, e desta forma, um grande número de espécies ainda permanece sem qualquer estudo químico e/ou biológico.

Dentre as espécies já estudadas está a *D. hirsuta*, que é utilizada como cicatrizante e apresentou atividade antibacteriana (LOPEZ, HUDSON E TOWERS, 2001) e atividade antiviral contra HSV (*Herpes simplex virus*) em estudos *in vitro* (KHAN *et al.*, 2005). Do extrato de suas folhas foram isolados flavona, iridoide lactona, um flavonol (AQUINO *et al.*, 1999) e um iridoide tetracíclico (PAGE, MADRIÑÁN, TOWERS, 1994). *D. hirsuta*, é conhecida popularmente como "jardim-do-diabo", pois nenhuma outra espécie vegetal cresce ao seu redor. Isto se deve ao fato da simbiose existente com a formiga *Mymelachista schumanni*. É beneficiada pelo ácido fórmico sintetizado pelas formigas, agindo como um herbicida natural impedindo o crescimento de outras plantas próximas (FREDERICKSON, GREENE E GORDON, 2007). Anteriormente a esse estudo acreditava-se que isto ocorria pela forte alelopatia causada por aleloquímicos tóxicos, como o iridoide plumericina (PAGE, MADRIÑÁN, TOWERS, 1994), porém não se exclui a possibilidade da ocorrência simultânea da alelopatia (FREDERICKSON, GREENE E GORDON, 2007).

Da espécie *D. macrophylla* foram isolados o alcaloide indólico raunitidina (NUNEZ *et al.*, 2009) e outros dois alcaloides, sendo um deles inédito na literatura (NUNEZ *et al.*, 2012a), no qual apresentou alta atividade antitumoral. Foram isolados dois triterpenos, ácido ursólico e ácido oleanólico, ambos com atividade antimicobacteriana frente à *Mycobacterium tuberculosis* (MARTINS *et al.*, 2013). Outros alcaloides com atividade contra a mesma micobactéria foram isolados, além de substâncias aromáticas (fenóis e flavonoides) e terpenos com atividade antioxidante, inseticida contra *Sitophilus zeamais* e toxicidade frente à *Artemia salina* (MARTINS *et al.*, 2014) (figura 3).

**Figura 3.** Estruturas moleculares de alcaloides isolados da espécie *Duroia macrophylla*.



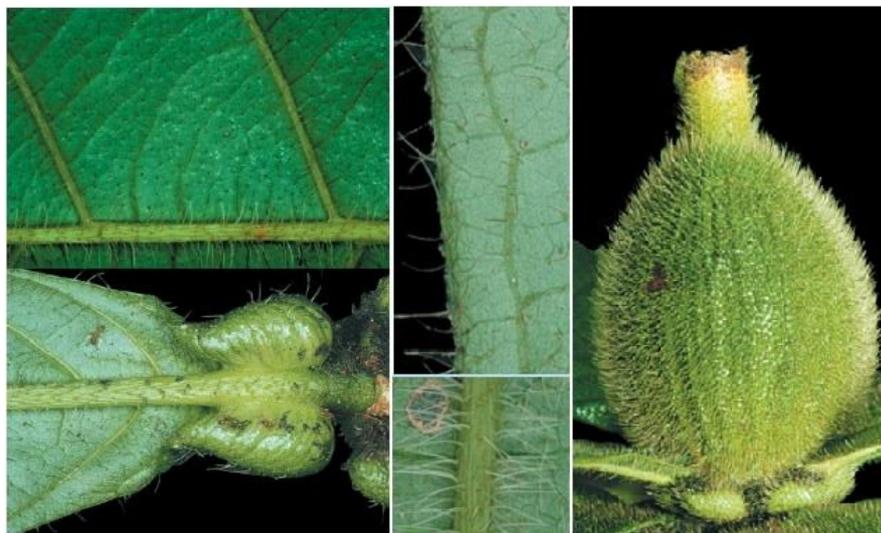
Devido a este potencial químico-biológico da espécie, duas patentes foram geradas e depositadas no INPI (NUNEZ E VASCONCELOS, 2012b; NUNEZ *et al.*, 2014). Além disso, em estudo recente de Zanca e colaboradores (2016), foi descrito o estabelecimento e a indução de calos *in vitro* e a análise química dos extratos dos calos, no qual apresenta indícios da presença de terpenos. Todos esses trabalhos citados com a espécie *D. macrophylla* foram desenvolvidos pelo grupo de pesquisa no qual este trabalho está inserido, visto que o grupo de plantas estudado demonstra potencial relevante tornando-se alvo de pesquisas.

## 2.6 *Duroia saccifera*

*Duroia saccifera* (Roem. & Schult.) K. Schum (figura 4) ocorre na Venezuela, Colômbia, Peru e Brasil (RIBEIRO *et al.*, 1999). No Brasil, ocorre nos estados do Acre, Amazonas, Pará e Rondônia, podendo crescer tanto em floresta de igapó, quanto em floresta de terra firme ou de várzea (FLORA DO BRASIL, 2017). No

Brasil, é conhecida como “cabeça-de-urubu”, “puruí-da-mata” ou “puruí-grande” (CAVALCANTE, 1974).

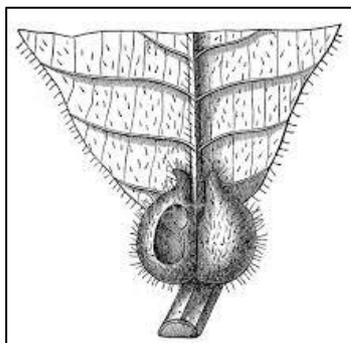
**Figura 4.** Detalhes característicos de partes vegetativas de *Duroia saccifera*.



Fonte: Ribeiro, 1999.

É facilmente reconhecível, mesmo em estado vegetativo, por ser uma árvore de pequeno porte, com folhas grandes, pilosas e com um par de domáceas conspícuas características na base das folhas (figura 5), as quais são habitadas por formigas muito pequenas, vermelhas e agressivas (*Azteca* sp.) em associação mutualística (mirmecofilia) (CAMPOS E BRITO, 1999; TAYLOR, CAMPOS E ZAPPI, 2007).

**Figura 5.** Ilustração do par de domáceas conspícuas na base da folha da espécie *Duroia saccifera*.



Fonte: [www.alamy.com](http://www.alamy.com) (acesso em 18/05/2017).

Apesar desta espécie se destacar pela abundância na floresta amazônica, poucos estudos são encontrados. Estudos fitoquímicos com a espécie *D. saccifera* vem sendo desenvolvidos pelo grupo de pesquisa ao qual este trabalho está inserido, visto que o potencial químico-biológico das espécies correlacionadas a ela, no caso a família Rubiaceae e o gênero *Duroia*, é amplamente conhecido na literatura.

Dois trabalhos relatam o estudo dos extratos obtidos das plantas. Mesquita e colaboradores (2015) relatam a presença de triterpenoides no extrato metanólico de folhas, sem toxicidade frente à *Artemia salina* e com propriedades antioxidantes. Contreras-Mejia (2017) relatou a identificação do flavonoide 5-hidroxi-3,4',7 trimetoxiflavona e indícios da presença de alcaloides, sendo um deles derivado da quinolina no qual foi proposta a sua estrutura molecular inédita na literatura, ainda sob validação. Foi verificado que o extrato hexânico das folhas apresentou atividade antibacteriana frente aos micro-organismos *Salmonella enterica*, *Propionibacterium acnes* e *Enterobacter cloacae*.

Além disso, o presente trabalho dá continuidade à tese de doutorado de Souza (2016), na qual foi desenvolvido o protocolo de assepsia e germinação de sementes da espécie *D. saccifera* e, posteriormente, foi estabelecida a indução de calos friáveis a partir de folhas das plântulas. Em uma análise química prévia dos extratos obtidos dos calos foi observado o indício da presença de terpenos e esteroides, com algumas atividades antimicrobiana e antifúngica significativas.

Do mesmo modo, ainda se faz necessária a otimização no estabelecimento das culturas de células e tecidos vegetais da espécie, a fim de obter culturas viáveis para a extração de metabólitos secundários. Para isso, se torna fundamental investigar o crescimento celular, mudanças no pH, consumo das fontes de carbono, atividades enzimáticas, acúmulo de metabólitos (que também podem ser secretados e, portanto, a determinação de metabólitos no meio de cultura deve ser levada em consideração), entre outros parâmetros (GAOSHENG E JINGMING, 2012). Para isso, além de estudos fitoquímicos, o estabelecimento de culturas em suspensão e o estudo da cinética de crescimento das células em meio líquido se faz essencial.

Para a seleção da espécie *D. saccifera* como foco de estudo neste trabalho foram levadas em consideração as informações botânicas e quimiotaxonômicas da

família e do gênero, de modo que se torna maior a probabilidade de encontrar substâncias bioativas, sejam elas inéditas ou já descritas na literatura. Esta dissertação foi dividida em dois capítulos para a melhor organização e compreensão. O primeiro capítulo consiste no estudo fitoquímico dos extratos dos calos de *D. saccifera* obtidos através da cultura de células vegetais *in vitro* e o segundo capítulo consiste no estudo da cinética de crescimento de células em suspensão.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer culturas em suspensão celular *in vitro* a partir de calos de *Duroia saccifera*, avaliar o potencial de crescimento dos calos e das células em suspensão e realizar o estudo fitoquímico dos extratos obtidos dos calos, bem como avaliar as atividades químicas e biológicas dos mesmos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudo fitoquímico dos extratos dos calos;
- Avaliar as atividades antibacteriana, antimicobacteriana e antioxidante dos extratos dos calos;
- Determinar a curva de crescimento dos calos induzidos a partir de folhas de plântulas de *D. saccifera* obtidos por Souza (2016);
- Estabelecer o sistema de cultivo de células em suspensão;
- Determinar a curva de crescimento das suspensões celulares, visando a identificação das fases de crescimento e as variações na produção de metabólitos secundários ao longo do tempo de cultivo;
- Realizar o estudo comparativo dos parâmetros cinéticos de crescimento entre calos cultivados em meio semissólido e células cultivadas em meio líquido.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL VEGETAL ESTABELECIDO EM CULTURAS *IN VITRO*

Foi utilizado como material vegetal os calos obtidos a partir de explantes foliares de plântulas de *Duroia saccifera*, germinadas *in vitro* por Souza (2016) (Figura 6). As sementes de *D. saccifera* utilizadas para germinação foram coletadas de um indivíduo adulto na Reserva Adolfo Ducke, localizada no município de Manaus, Amazonas, sendo uma exsicata depositada para a confirmação da espécie no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sob o registro nº 25922.

**Figura 6.** Calo friável de *Duroia saccifera* após 30 dias de cultivo *in vitro*.



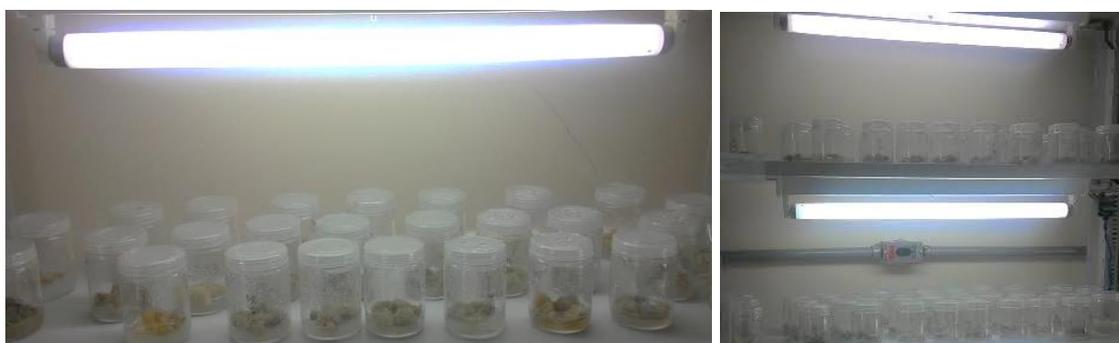
Fonte: acervo pessoal.

Os calos estabelecidos em cultura *in vitro* foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio de cultura Murashige e Skoog (1962) (MS) com 100% dos nutrientes, adicionados de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g.L<sup>-1</sup> de agente geleificante ágar e na presença dos reguladores de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) e cinetina (KIN), nas concentrações 4 e 2 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os calos foram mantidos na sala de crescimento do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABB), do INPA, sob condições controladas.

## 4.2 MULTIPLICAÇÃO DE CALOS *IN VITRO*

A fim de aumentar a massa de calos para a preparação dos extratos, os calos foram transferidos de tubos de ensaio para frascos de 80 mL, contendo 25 mL de meio de cultura, na mesma composição utilizado para a indução, e foram submetidos a sucessivos subcultivos a cada 30 dias. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de  $26 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro, providos por lâmpadas fluorescentes (Figura 7).

**Figura 7.** Calos de *Duroia saccifera* mantidos em frascos e em estantes na sala de crescimento durante a fase de multiplicação celular.



Fonte: acervo pessoal.

## 4.3 ESTUDO FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS DOS CALOS *IN VITRO*

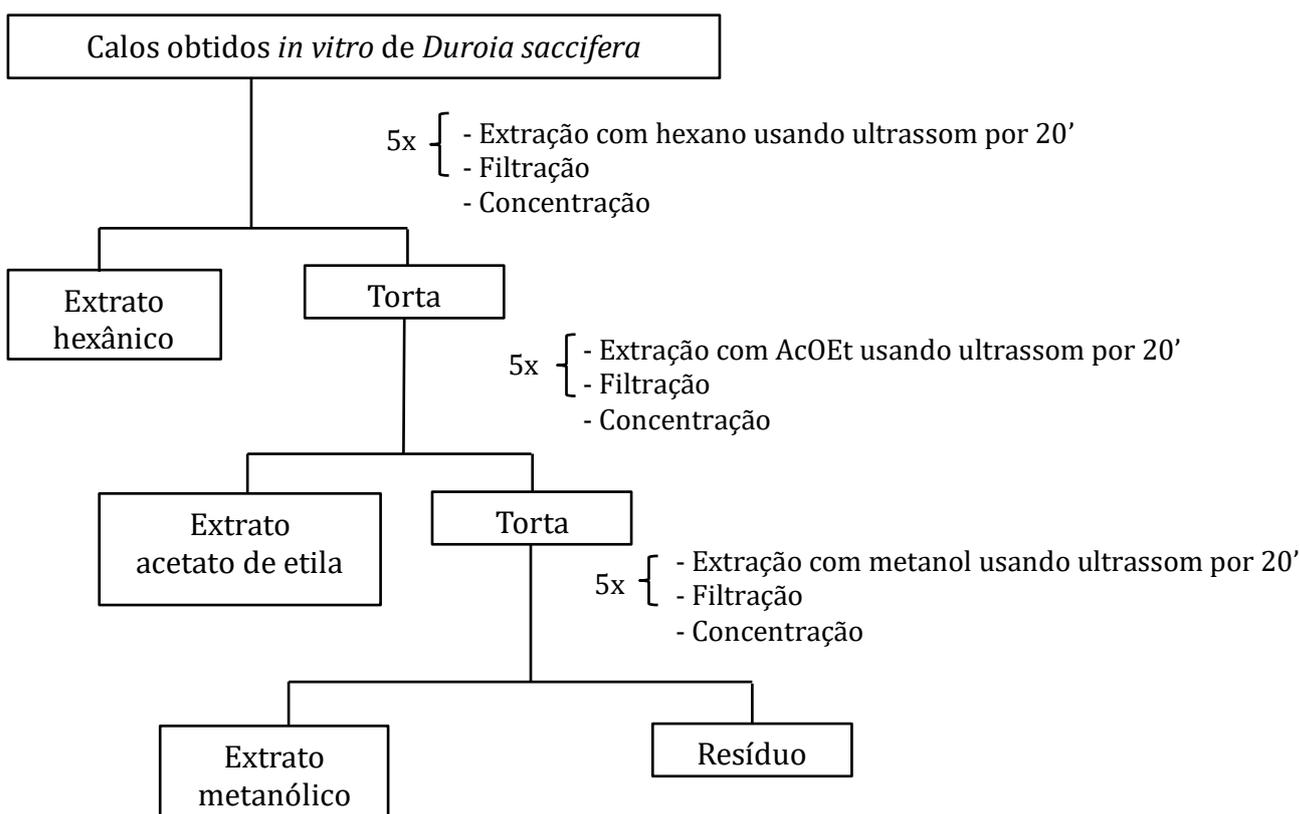
### 4.3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL PARA O ESTUDO QUÍMICO

Os calos foram retirados do meio de cultura e pesados para determinação da massa fresca. Foi feita a lavagem dos calos com água destilada para retirada de fragmentos de meio de cultura. Para isso, foi utilizado um funil de Buchner com papel de filtro acoplado a um kitasato, o qual foi conectado a uma bomba de vácuo para acelerar a filtração pela sucção ocorrida. Após isso, o material foi novamente pesado para obtenção da massa fresca e foi congelado na temperatura de -20 °C. Posteriormente, este material foi liofilizado por aproximadamente 72 horas para retirada completa da água, resultando na massa seca total.

#### 4.3.2 PREPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS

O material obtido após a secagem foi pulverizado utilizando almofariz e pistilo. Após a pulverização, as substâncias do material foram extraídas com solventes orgânicos em ordem de polaridade crescente (hexano, acetato de etila - AcOEt e metanol - MeOH), na proporção de 10 mL de solvente para cada grama de material vegetal. Foram realizadas cinco (5) extrações com cada solvente, utilizando um banho de ultrassom por 20 minutos para cada extração. Após o banho de ultrassom, o material foi filtrado e o resíduo após as extrações foi descartado. Os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico foram concentrados utilizando evaporador rotativo sob pressão reduzida (Figura 8).

**Figura 8.** Fluxograma geral da preparação dos extratos dos calos de *Duroia saccifera*.



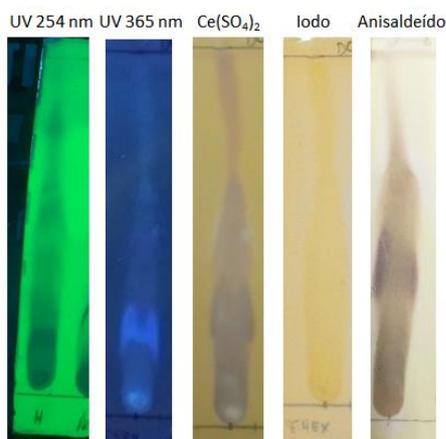
#### 4.3.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Os extratos dos calos foram analisados inicialmente por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e por ressonância magnética nuclear (RMN)

de  $^1\text{H}$  (item 4.3.6), a fim de obter informações sobre as classes químicas presentes, assim como as frações foram submetidas aos mesmos procedimentos.

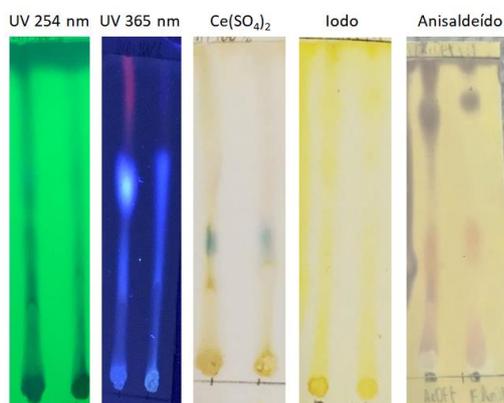
Para as CCDCs foram utilizadas placas cromatográficas de alumínio com sílica gel e com indicador de fluorescência ultravioleta (UV) 254 nm. O extrato hexânico foi eluído com o solvente diclorometano (DCM 100%) e para a revelação das cromatoplasas foi empregada luz UV (comprimento de onda de 254 e 365 nm), anisaldeído sulfúrico, sulfato cérico ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ) e iodo (figura 9). O extrato acetato de etila foi eluído em DCM/AcOEt 1:1 (v/v) e revelado com luz UV (254 e 365 nm), anisaldeído,  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  e iodo (figura 10).

**Figura 9.** CCDC do extrato hexânico obtido dos calos *in vitro* da espécie *Duroia saccifera*.



Legenda: sistema de eluição DCM 100%.

**Figura 10.** CCDC do extrato AcOEt e da fase AcOEt do extrato MeOH obtidos dos calos *in vitro* da espécie *Duroia saccifera*.



Legenda: sistema de eluição DCM/AcOEt 1:1 (v/v).

Não foi encontrado um bom sistema de eluição para o extrato metanólico, que foi então submetido à partição líquido-líquido, descrita no item 4.3.5.1, resultando em duas fases: AcOEt e MeOH/H<sub>2</sub>O. A fase mais interessante devido às classes de substâncias com polaridade mediana das moléculas presentes foi a AcOEt. Essa última foi analisada em CCDC com os mesmos sistemas de eluição e revelação do extrato AcOEt dos calos (figura 10).

Para a análise em CCDC das frações obtidas dos fracionamentos foram utilizadas outras combinações e proporções de solventes orgânicos conforme as características químicas das amostras. A seguir estão mostrados os fracionamentos dos extratos e fases e o fluxograma geral (figura 21).

#### 4.3.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DOS CALOS

##### 4.3.4.1 COLUNA CROMATOGRÁFICA ABERTA DO EXTRATO HEXANO

Para o fracionamento do extrato hexânico (288,5 mg) em coluna aberta (36,5 cm x 1,5 cm) foi escolhida a sílica (28,85 g) como fase estacionária. Como fase móvel foi utilizado o sistema de eluição descrito na tabela 3. O volume da coluna empacotada foi de 60 mL e o volume de cada sistema foi de 80 mL. O volume total passado pela coluna foi 880 mL. Foram coletadas um total de 39 frações.

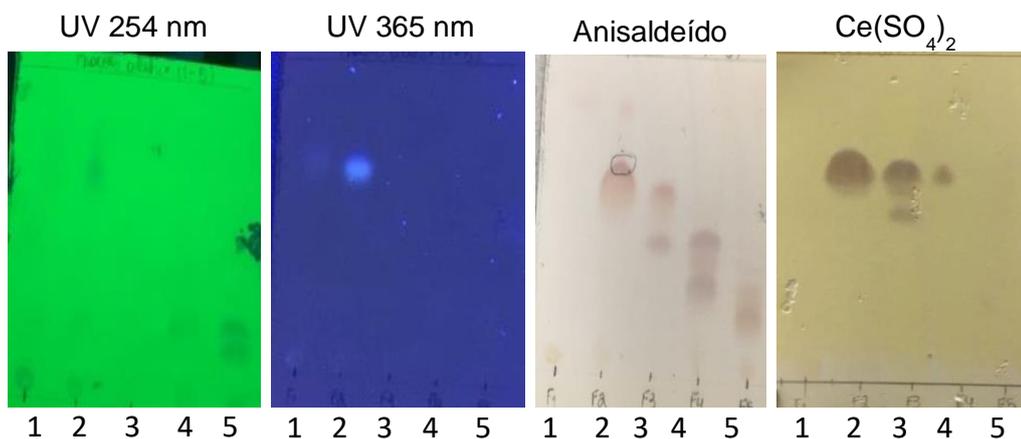
**Tabela 3.** Sistemas de eluição da coluna cromatográfica do extrato hexânico obtidos de calos de *Duroia saccifera*.

<b>Eluentes</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Frações coletadas</b>
Hex/DCM 7:3	80	1-2
Hex/DCM 1:1	80	3-6
Hex/DCM 3:7	80	7-10
DCM 100%	80	11-13
DCM/AcOEt 9:1	80	14-17
DCM/AcOEt 8:2	80	17-20
DCM/AcOEt 7:3	80	21-24
DCM/AcOEt 1:1	80	25-28
AcOEt 100%	80	29-32

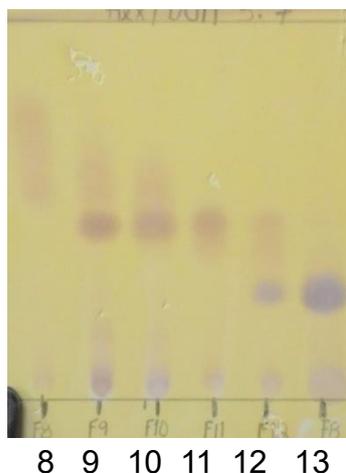
Continuação		
AcOEt/MeOH 9:1	80	33-36
MeOH 100%	80	37-39

As frações da coluna do extrato hexânico foram submetidas à análise em CCDC e reveladas com luz UV (254 e 365 nm), anisaldeído e  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ . As frações que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes e maior grau de pureza foram reunidas. Inicialmente foram selecionadas três frações. A fração 2 (6,3 mg) foi submetidas à análise em CCDC e reveladas com luz UV (254 e 365 nm), anisaldeído e  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  (figura 11), a fração 9-11 (9,0 mg) foi analisada com luz UV (254 e 365 nm) e  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  (figura 12), e a fração 27-30 (10,6 mg) foi revelada com luz UV (254 e 365 nm), anisaldeído e  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  (figura 13). As duas últimas frações foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a análise e tentativa de purificação, além disso todas foram submetidas a análise de RMN de  $^1\text{H}$ .

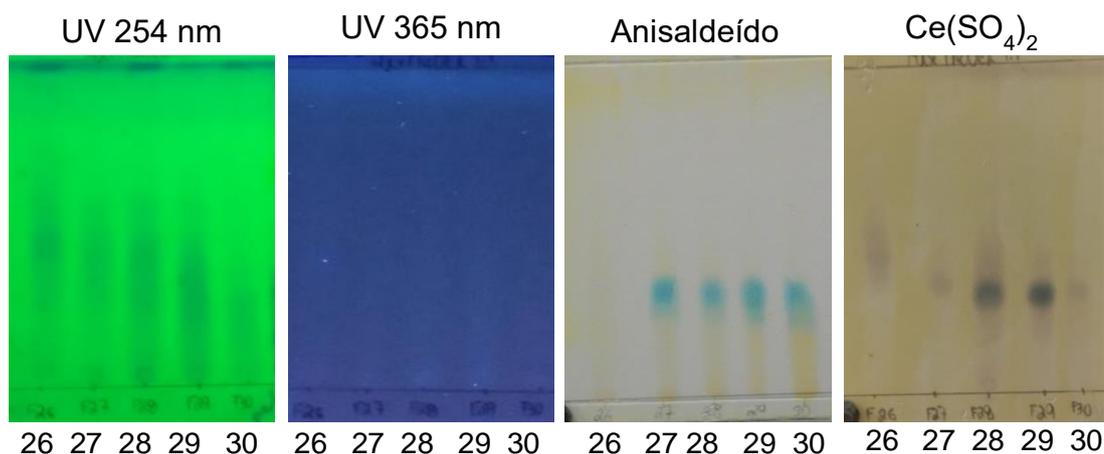
**Figura 11.** CCDC das frações 1 a 5 da coluna do extrato hexano, eluída com hex/DCM 7:3.



**Figura 12.** CCDC das frações 8 a 13 da coluna do extrato hexano, eluída com hex/DCM 3:7 e revelada com  $Ce(SO_4)_2$ .



**Figura 13.** CCDC das frações 26 a 30 da coluna do extrato hexano, eluída com hex/AcOEt 1:1.



#### 4.3.4.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A fração 9-11 (9,0 mg) foi dissolvida em MeOH e analisada em CLAE usando coluna analítica (Phenomenex® C18 250 mm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m) com volume de injeção de 10  $\mu$ L e fluxo de 1 mL/min. A purificação foi realizada em coluna semi-preparativa (Phenomenex® C18 250 x 10 mm, 5  $\mu$ m) com volume de injeção de 50  $\mu$ L e fluxo de 4 mL/min. A análise foi realizada no modo normal de eluição, no sistema isocrático utilizando MeOH 100%. Foram coletadas 5 frações, sendo que as primeiras foram reunidas por não ter ocorrido separação aparente das substâncias e

a fração 5 (1,0 mg), que se apresentou como um pico intenso isolado, foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ .

A fração 27-30 (10,6 mg) foi dissolvida em MeOH e também analisada em CLAE usando coluna analítica (Phenomenex® C18 250 mm x 4,6 mm x 4  $\mu\text{m}$ ) com volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$  e fluxo de 1 mL/min. A purificação foi realizada em coluna semi-preparativa (Phenomenex® C18 250 x 10 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) com volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$  e fluxo de 4 mL/min. Foi utilizado um sistema isocrático MeOH 100% para eluição. Foram coletadas 4 frações das quais a fração 4 foi novamente submetida a purificação para retirada de contaminantes. Nessa técnica, os solventes utilizados foram degaseificados e ultrafiltrados e apresentavam grau de pureza espectroscópico (TEDIA).

#### 4.3.5 FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO DOS CALOS

##### 4.3.5.1 PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Iniciou-se o fracionamento do extrato metanólico por meio da partição líquido-líquido para obtenção das fases seletivas de substâncias com afinidade por cada solvente. Para isso, o extrato metanólico foi solubilizado em 50 mL de MeOH e, em seguida, foi adicionado o mesmo volume de água destilada. Posteriormente, em um funil de separação foi adicionado o extrato solubilizado em MeOH/H<sub>2</sub>O e mais 100 mL do solvente AcOEt. O funil foi agitado levemente para promover o contato das substâncias com o solvente AcOEt.

Para recolher as fases separadamente, o funil foi deixado em repouso até a visualização da separação das duas fases: uma hidrometanólica (inferior) e outra acetato de etila (superior). Foi coletada a fase AcOEt e hidrometanólica separadamente. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes. As fases foram concentradas em evaporador rotativo. Na Figura 10 são mostradas as CCDCs da fase AcOEt/MeOH quando eluídas com DCM/AcOEt 1:1 (v/v) e reveladas com diferentes reveladores.

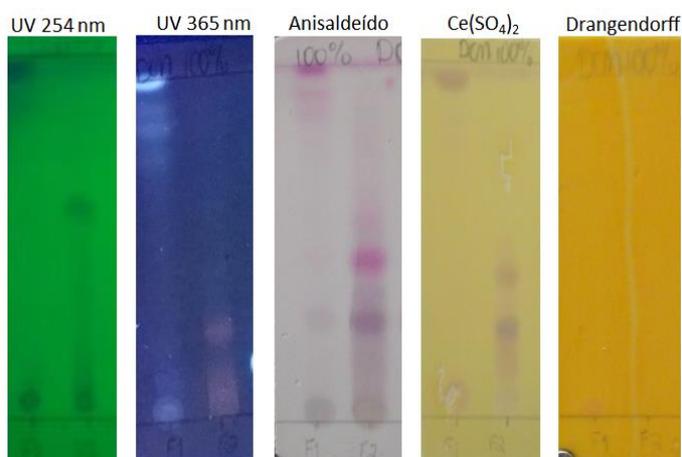
#### 4.3.5.2 COLUNA CROMATOGRÁFICA FILTRANTE DA FASE ACETATO DE ETILA DO EXTRATO METANÓLICO

O fracionamento da fase AcOEt de extrato MeOH (1,7257g) foi feito em 1 funil de separação contendo sílica (120 g), como adsorvente, acoplado a um kitasato, o qual é conectado a uma bomba de vácuo para realizar a sucção. O volume dos sistemas de eluição foi de 270 mL e o volume da coluna empacotada de 230 mL (tabela 4). Foram coletadas 7 frações, as quais estão descritas na tabela 3, com os respectivos eluentes utilizados. Nas figuras 14, 15 e 16, a seguir, são mostradas as CCDCs correspondentes a essas frações coletadas, sendo que as frações 5, 6 e 7 foram avaliadas, mas não foi possível encontrar um bom sistema de separação.

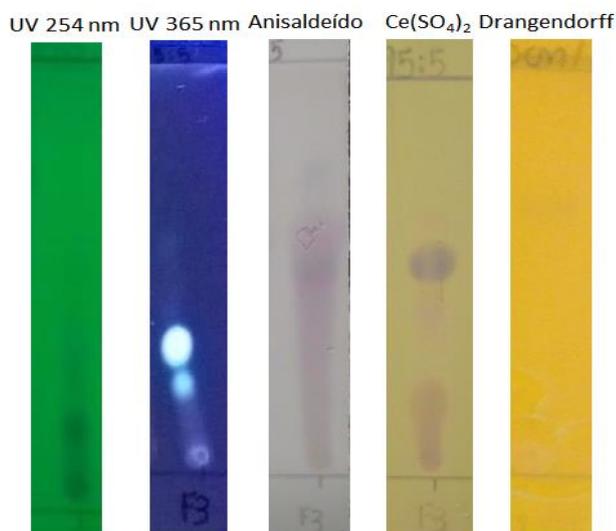
**Tabela 4.** Sistemas de eluição da coluna filtrante da fase AcOEt obtidos do extrato metanólico de calos *in vitro* da espécie *Duroia saccifera*.

Eluentes	Volume (mL)	Fração correspondente	Massa (mg)
DCM 100%	270	1	11,7
DCM/AcOEt 8:2	216/54	2	10,4
DCM/AcOEt 1:1	135/135	3	20,2
AcOEt/acetona 9:1	243/27	4	60,9
AcOEt/acetona 1:1	135/135	5	52,9
Acetona 100%	270	6	64,3
MeOH 100%	270	7	684,1

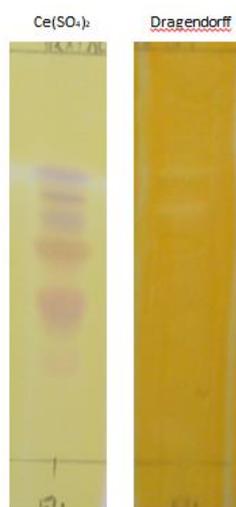
**Figura 14.** CCDC das frações 1 e 2 da coluna da fase AcOEt, eluídas com DCM 100%.



**Figura 15.** CCDC da fração 3 da coluna da fase AcOEt, eluído com DCM/AcOEt 95:5.



**Figura 16.** CCDC da fração 4 da coluna da fase AcOEt, eluído com hex/AcOEt 6:4.



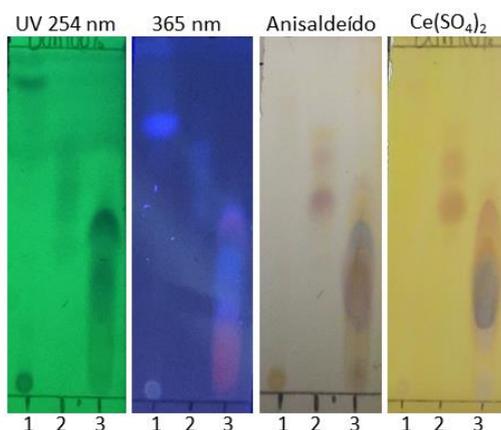
#### 4.3.5.3 COLUNA CROMATOGRÁFICA ABERTA DA FRAÇÃO F2-3

Para o fracionamento da amostra F2-3 (27,8 mg) em coluna aberta (5,0 cm x 1,4 cm) foi escolhida a sílica (2,7 g) como fase estacionária. Como fase móvel foram utilizados os sistemas de eluição descritos na tabela 5. O volume morto foi de 20 mL e o volume de cada sistema foi de 10 mL. O volume total passado pela coluna foi 100 mL. Foram coletadas o total de 11 frações. Na figura 17, 18, 19 e 20, a seguir, são mostradas as CCDCs correspondentes as frações coletadas, reveladas com UV 254 e 365 nm, anisaldeído e  $Ce(SO_4)_2$ .

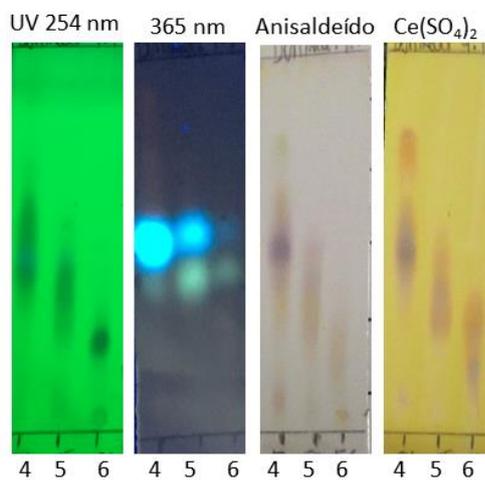
**Tabela 5.** Sistemas de eluição da coluna da fração 2-3 da fase AcOEt obtidos do extrato metanólico de calos *in vitro* da espécie *Duroia saccifera*.

Eluentes	Volume (mL)
DCM 100%	10 (2x)
DCM/AcOEt 95:5	9,5/0,5 (2x)
DCM/AcOEt 9:1	9,0/1,0
DCM/AcOEt 8:2	8,0/2,0
AcOEt 100%	10 (2x)
MeOH 100%	10 (2x)

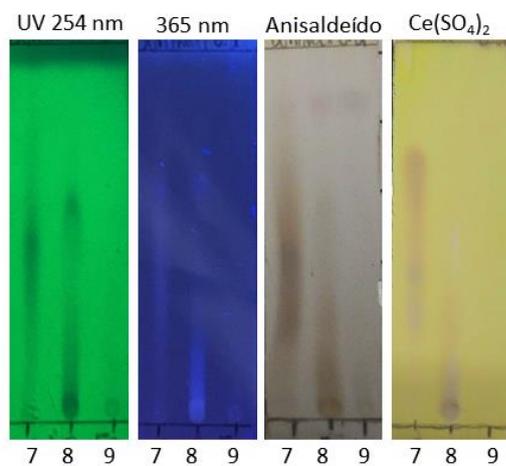
**Figura 17.** CCDC das frações 1 (2,8 mg), 2 (1,3 mg) e 3 (6,8 mg) da coluna fração 2-3 da fase AcOEt, eluído com DCM 100%.



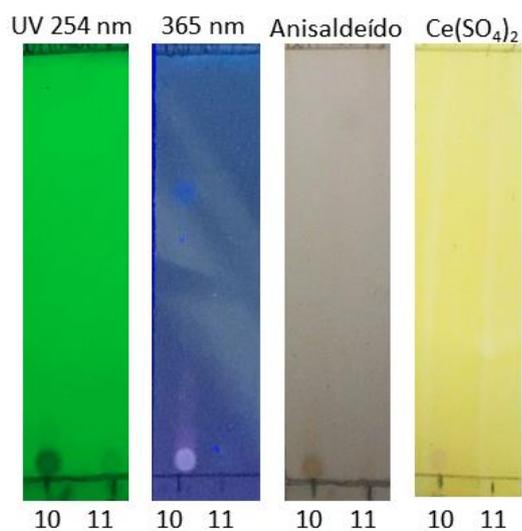
**Figura 18.** CCDC das frações 4 (3,1 mg), 5 (1,6 mg) e 6 (6,4 mg) da coluna fração 2-3 da fase AcOEt, eluído com DCM/AcOEt 9:1.



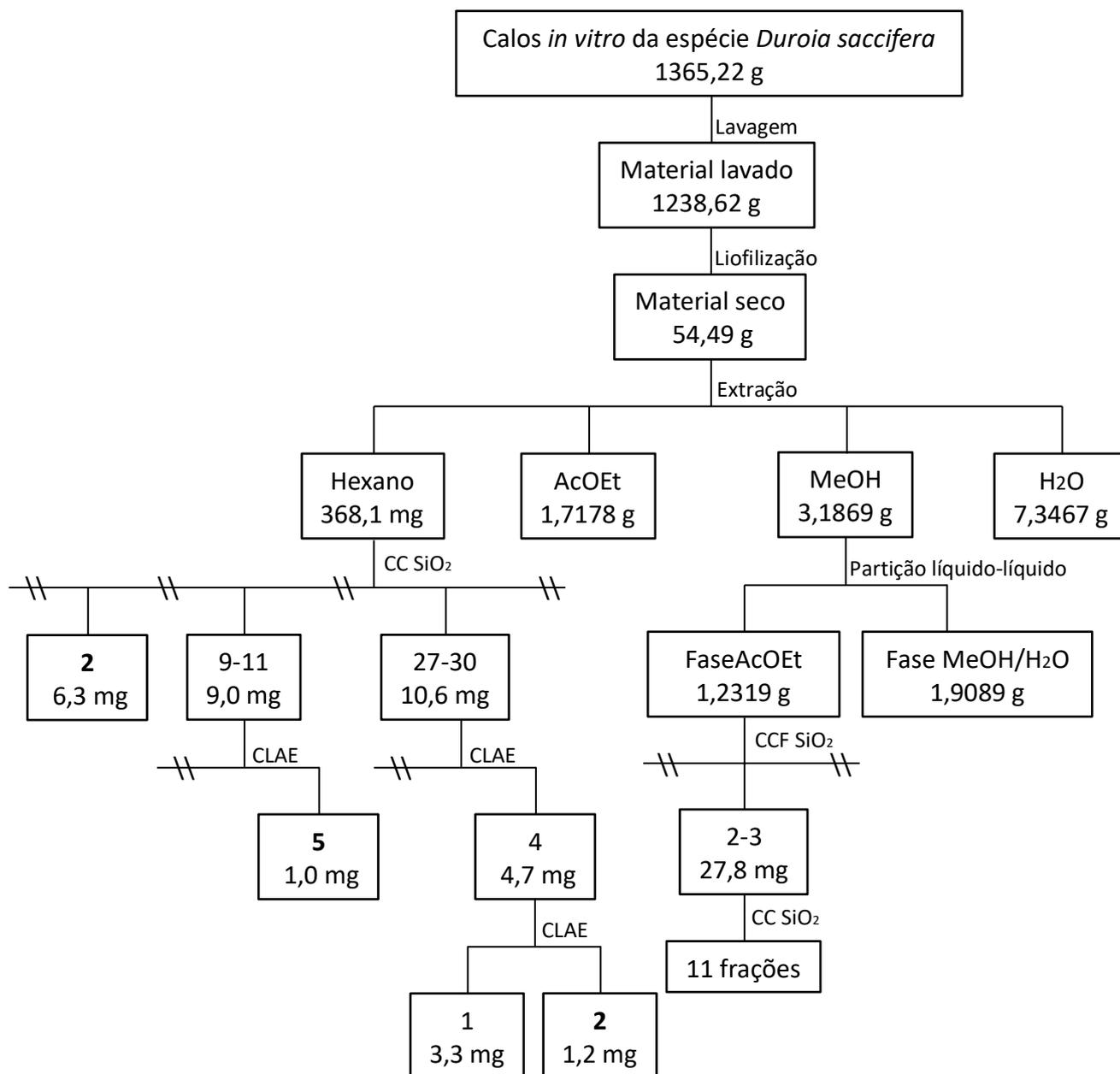
**Figura 19.** CCDC das frações 7(3,0 mg), 8 (2,2 mg) e 9 (0,9 mg) da coluna fração 2-3 da fase AcOEt, eluído com DCM/AcOEt 8:2.



**Figura 20.** CCDC das frações 10 (3,4 mg) e 11 (0,8 mg) da coluna fração 2-3 da fase AcOEt, eluído com DCM/AcOEt 7:3



**Figura 21.** Fluxograma geral da obtenção dos extratos de calos *in vitro* de *Duroia saccifera* e os fracionamentos realizados.



#### 4.3.6 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^1\text{H}$

Foram feitas análises em ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  (unidimensional). Para isso, os extratos foram dissolvidos em solventes deuterados: o extrato hexânico em  $\text{CDCl}_3$  e os demais extratos e fases em  $\text{DMSO-}d_6$ . Foi utilizado o equipamento espectrômetro Bruker Fourier 300, operando em 300 MHz para o núcleo de  $^1\text{H}$  disponível na Central Analítica do Laboratório Temático Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN/INPA).

#### 4.3.7 ENSAIOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

##### 4.3.7.1 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Foi realizado o ensaio para avaliar o potencial antioxidante dos extratos e das fases pelo método quantitativo utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ /fenantrolina. Para a equivalência dos resultados obtidos foram feitas as curvas de calibração com o ácido ascórbico (antioxidante padrão).

Inicialmente, foram preparadas as soluções de DPPH (28  $\text{mg.mL}^{-1}$ ),  $\text{Fe}^{3+}$ , 1,10-fenantrolina 0,25% e a solução de ácido ascórbico com água deionizada em uma concentração de aproximadamente 900  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a partir da qual foram preparadas diluições, resultando nas seguintes concentrações: 0, 90, 180, 360, 540 e 720  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para obtenção da curva do DPPH, foram adicionados 990  $\mu\text{L}$  da solução mais 10  $\mu\text{L}$  das soluções do ácido ascórbico nas diferentes concentrações, separadamente. Para a curva de  $\text{Fe}^{3+}$ /fenantrolina, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  da solução de ácido ascórbico nas diferentes concentrações, mais 10  $\mu\text{L}$  da solução padrão de  $\text{Fe}^{3+}$  e 980  $\mu\text{L}$  da solução 1,10-fenantrolina 0,25%. Foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 e 508 nm, após 30 minutos e 1 hora, respectivamente para DPPH e  $\text{Fe}^{3+}$ .

Para avaliação das amostras, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de cada (na concentração de 5,0  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) em 990  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH. Após 30 minutos da reação, foi realizada a leitura da absorbância em 517 nm. Para o ensaio com  $\text{Fe}^{3+}$ /fenantrolina, foram adicionados 980  $\mu\text{L}$  da solução de 1,10-fenantrolina, 10  $\mu\text{L}$

da solução de  $\text{Fe}^{3+}$  e 10  $\mu\text{L}$  da solução de cada amostra. A leitura da absorbância foi feita em 508 nm. Como controle negativo foi utilizado a 990  $\mu\text{L}$  de DPPH e 10  $\mu\text{L}$  do solvente e a 1,10-fenantrolina em cada ensaio respectivamente. Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### 4.3.7.2 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIMICOBACTERIANA

A concentração inibitória mínima (CIM) é considerada a menor concentração do extrato/sustância onde não houve crescimento bacteriano. A determinação da CIM foi realizada em meio líquido, através da técnica de microdiluição, conforme a metodologia descrita por CLSI (2003) e Eloff (1998). Foi pesado 1 mg de cada um dos extratos e posteriormente solubilizado em DMSO 10%, obtendo assim a concentração final de 1  $\text{mg.mL}^{-1}$ . As amostras foram testadas frente às bactérias patogênicas *Citrobacter freundii*, *Salmonella enterica* e *Enterobacter cloacae*.

O teste foi realizado em placas de 96 poços, onde foi adicionado em cada poço, em triplicata, 100  $\mu\text{L}$  do meio de cultura Müller-Hilton (MH), 100  $\mu\text{L}$  do extrato e 10  $\mu\text{L}$  do inóculo bacteriano preparado na concentração  $1,5 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$  (o equivalente a 0,5 na escala de McFarland). Os extratos foram diluídos sucessivamente para a obtenção das concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 13,62 e 7,81  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A placa foi incubada a 29 °C por um período de 24 h. Para obtenção dos resultados foram feitas leituras em espectrofotômetro antes e depois da adição do inóculo bacteriano e a CIM foi detectada com o auxílio do revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (2  $\text{mg.mL}^{-1}$ ). Como controle positivo foi usado o antibiótico oxitetraciclina na concentração 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e como controle negativo os inóculos bacterianos, além do controle da esterilidade meio. Esses ensaios foram realizados no LABB.

Também foram realizados os ensaios para avaliar a atividade antibacteriana e determinar a CIM, em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , dos extratos AcOEt e MeOH frente as espécies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*, utilizando a técnica de microdiluição em caldo conforme CLSI - M100-S23 (2013). A concentração máxima testada foi de 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Não havendo inibição nesta concentração considerou-se o extrato “não ativo”. Esses ensaios foram realizados pelo aluno do grupo de

pesquisa Marcos Salazar, sob supervisão da Profa. Dra. Daniela Fernandes Ramos, no Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica (NUPEMM) da faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) no Rio Grande do Sul.

Assim como, para a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv: ATCC 27294), foram determinadas a CIM, a concentração inibitória de 90% do crescimento da população bacteriana (IC<sub>90</sub>) e a concentração bactericida mínima (CBM). Para isso, foram adicionados 75 µL do inóculo em uma placa de 96 poços contendo 75 µL de meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) e 75 µL dos extratos em diluição seriada (1:2) a partir da concentração inicial. As placas foram incubadas por sete dias na temperatura de 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 30 µL de resazurina a 0,02% em cada poço e as placas foram incubadas por mais dois dias nas mesmas condições. A leitura foi baseada na mudança da coloração, onde do azul para o rosa indicou a ocorrência da oxirredução do corante devido ao crescimento bacteriano. Todos os ensaios foram feitos em triplicata, com os controles positivo (antibiótico), negativo (cepas) e do meio.

#### 4.4 ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE CALOS E CÉLULAS EM SUSPENSÃO CELULAR E ANÁLISE DE SEUS METABÓLITOS

##### 4.4.1 CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS FRIÁVEIS

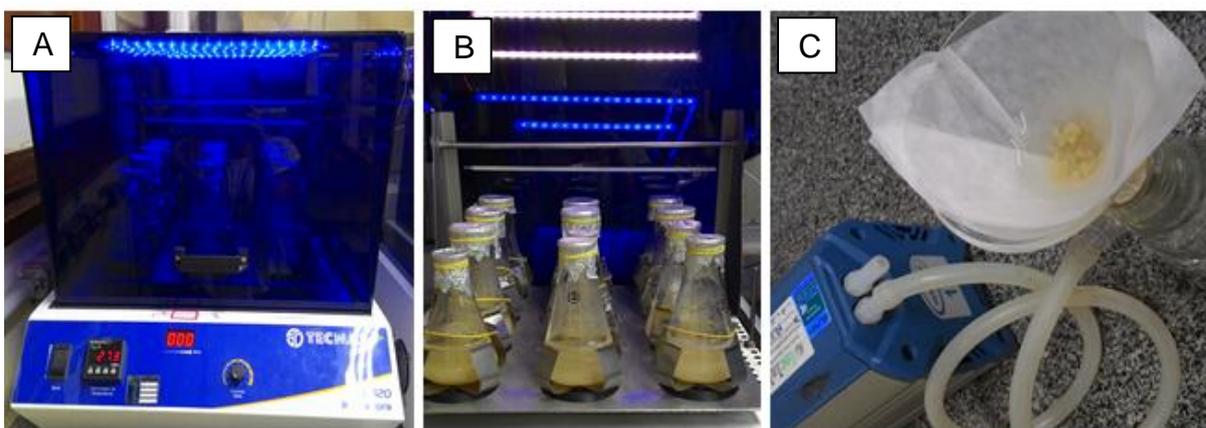
Para a obtenção da curva de crescimento, calos friáveis de 1 g de massa foram inoculados em 25 mL de meio MS semissólido suplementado. Foram feitas pesagens em intervalos de 3 dias, durante 30 dias subsequentes, em triplicata. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob condições controladas. Os calos foram pesados individualmente para a obtenção da massa fresca. Em seguida foram congelados e liofilizados separadamente para obtenção da massa seca. As curvas de crescimento, tanto da massa fresca quanto da seca, foram traçadas a partir das médias obtidas das diferenças entre as triplicatas.

#### 4.4.2 ESTABELECIMENTO E CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

Para o estabelecimento das suspensões e determinação da curva e crescimento de células em suspensão, 1 g de calos friáveis foram transferidos para erlenmeyers com tampa, contendo 100 mL de meio MS líquido suplementado. As suspensões foram cultivadas sob agitação contínua em incubadora com agitador orbital a 120 rpm, sob condições controladas (figura 22).

Foram retirados 3 erlenmeyers em intervalos de 4 dias, durante 40 dias e as células dos calos foram submetidas a filtração com auxílio de uma bomba à vácuo. Para isso, um funil contendo papel de filtro foi acoplado a um kitasato e conectado a uma bomba de vácuo. O conteúdo do erlenmeyers foi filtrado, separando a massa celular do meio de cultura líquido (figura 22.C). Foi feita a pesagem individualmente dos sedimentos para a obtenção da massa fresca. Em seguida, foram congelados e liofilizados separadamente para a obtenção da massa seca. As curvas de crescimento, tanto da massa fresca quanto da seca, foram traçadas a partir das médias obtidas das diferenças entre as triplicatas.

**Figura 22.** (A) e (B) Incubadora com agitador orbital a 120 rpm com erlenmeyer contendo células de calos de *Duroia saccifera* em meio MS líquido suplementado com 2,4D e KIN. (C) Bomba de vácuo para sucção de meio líquido.



Fonte: acervo pessoal.

#### 4.4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram

apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Testes de análise de variância simples (ANOVA) foram realizados para determinar se houve diferenças significativas entre as médias dos dados. Foi utilizado o software Statistica 7.0 para as análises estatísticas de regressão não linear para a determinação do crescimento pelo modelo matemático de Gompertz, considerando o intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). As figuras foram geradas usando o software GraphPad Prism 7.04 (versão para Windows 10).

#### 4.4.4 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CALOS E CÉLULAS EM SUSPENSÃO

##### 4.4.4.1 PREPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS

Para quantificar e verificar a composição química das células cultivadas em suspensão e em calos foi feita a preparação dos extratos hexânico e acetato de etila. As triplicatas foram reunidas, totalizando 22 amostras (tempo zero, 4<sup>o</sup>, 8<sup>o</sup>, 12<sup>o</sup>, 16<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup>, 24<sup>o</sup>, 28<sup>o</sup>, 32<sup>o</sup>, 36<sup>o</sup> e 40<sup>o</sup> dia de ambos os experimentos – calo e suspensão). Para isso, o material obtido após a liofilização foi reunido e em seguida pulverizado utilizando almofariz e pistilo. Posteriormente, o material foi extraído com os solventes orgânicos hexano e acetato de etila, na proporção de 10 mL de solvente para cada grama de material vegetal.

Foram realizadas 4 extrações com cada solvente, utilizando um banho de ultrassom por 20 minutos para cada extração. Após o banho de ultrassom, o material foi filtrado e o resíduo vegetal após as extrações foi descartado. Os extratos foram concentrados utilizando evaporador rotativo sob pressão reduzida.

##### 4.4.4.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA PARA ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA

Os extratos foram analisados por CCDC, a fim de obter informações sobre as classes químicas presentes e a produção de metabólitos ao longo do tempo de cultivo. Para as CCDCs foram utilizadas placas cromatográficas de alumínio com sílica gel e com indicador de fluorescência ultravioleta (UV) 254 nm. Para a padronização das amostras, os extratos foram solubilizados com o solvente  $\text{CHCl}_3$

na concentração de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Para a aplicação das amostras nas placas foi utilizado um pipetador automático, ajustado para alíquotas de  $10 \text{ }\mu\text{L}$ . Para a revelação das cromatoplacas foi empregada luz UV (254 e 365 nm), anisaldeído sulfúrico e  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ . Os extratos hexânicos dos calos e da suspensão celular foram eluídos em DCM/MeOH 98:2 (v/v), o acetato de etila dos calos eluídos em AcOEt/MeOH 98:2 (v/v) e o acetato de etila da suspensão em DCM/MeOH 95:5 (v/v).

#### 4.4.4.3 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Foram feitas análises por ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  dos extratos (hexânico e AcOEt) preparados a partir das amostras recolhidas durante os 40 dias de experimento da curva de crescimento de células em suspensão e dos calos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E FASES

A multiplicação dos calos, previamente estabelecidos *in vitro* por Souza (2016), ocorreu no período de 120 dias, totalizando 4 subcultivos a cada 30 dias. Os calos apresentaram coloração esbranquiçada, entre branco amarelado e branco e aspecto friável, um indicador de uma massa celular indiferenciada. Após os repiques, o crescimento dos calos permaneceu uniforme, sem a ocorrência de variação na morfologia ou coloração.

Foram realizados testes preliminares para verificar a possibilidade de minimizar as dificuldades enfrentadas por Souza (2016), quanto à presença de açúcares nos extratos dos calos. Desta forma, foi realizada a lavagem dos calos na etapa de obtenção do material vegetal para o estudo fitoquímico. As massas obtidas após o cultivo, após a lavagem e a massa seca final estão descritas na tabela 6.

**Tabela 6.** Massas resultantes de calos obtidos *in vitro* da espécie *Duroia saccifera*.

<b>Massa fresca de calos (g)</b>	<b>Massa fresca de calos após lavagem (g)</b>	<b>Massa seca (g)</b>
1365,22	1238,62	54,49

Levando em consideração o grande acúmulo de água no interior das células do calo, fato observado após a liofilização do material, essa metodologia mostra-se pouco eficiente no que diz respeito à obtenção de material para extração de metabólitos. Os baixos rendimentos em massa seca somado a produção de metabólitos secundários naturalmente em baixas concentrações, assinala a importância do uso de técnicas alternativas para que o processo seja favorável (WANG *et al.*, 2017).

Uma das alternativas para ultrapassar os baixos rendimentos alcançados em cultura de calos em meio semissólido é o estabelecimento de uma cultura de células em suspensão, mantida em meio líquido. A suspensão celular é uma técnica que pode possibilitar o aumento da biomassa vegetal devido às condições de cultivo

(ZHAO, DAVIS, VERPOORTE, 2005; WANG *et al.*, 2017). A seguir, na tabela 7, são descritos as massas e os rendimentos dos extratos preparados a partir dos calos de *Duroia saccifera*.

**Tabela 7.** Massas e rendimentos dos extratos e fases obtidos dos calos de *Duroia saccifera*.

Extrato	Fase	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano		0,3681	0,57
AcOEt		1,7178	2,81
MeOH		3,1869	5,51
	AcOEt	1,2319	-
	MeOH/H <sub>2</sub> O	1,9089	-
H <sub>2</sub> O		7,3467	13,88

No trabalho realizado anteriormente com os calos de *D. saccifera* (38,92 g de massa seca), Souza (2016) obteve 0,45, 1,06 e 8,88 g dos extratos hex, AcOEt e MeOH, respectivamente. Assim como os extratos vegetais de um indivíduo variam sazonalmente em seu ambiente natural ou devido a outros fatores, é compreensível que ocorra a variação nos rendimentos e na composição dos extratos obtidos de calos cultivados *in vitro*, visto que se trata de uma cultura de células vegetais. Bourgaud e colaboradores (2001) relatam que após a localização de indivíduos promissores, são estabelecidas as culturas *in vitro* de calos, buscando a melhor adaptação ao meio. Estes calos, mantidos através de subcultivos sucessivos, podem necessitar de semanas ou mesmo de anos para atingir a estabilidade.

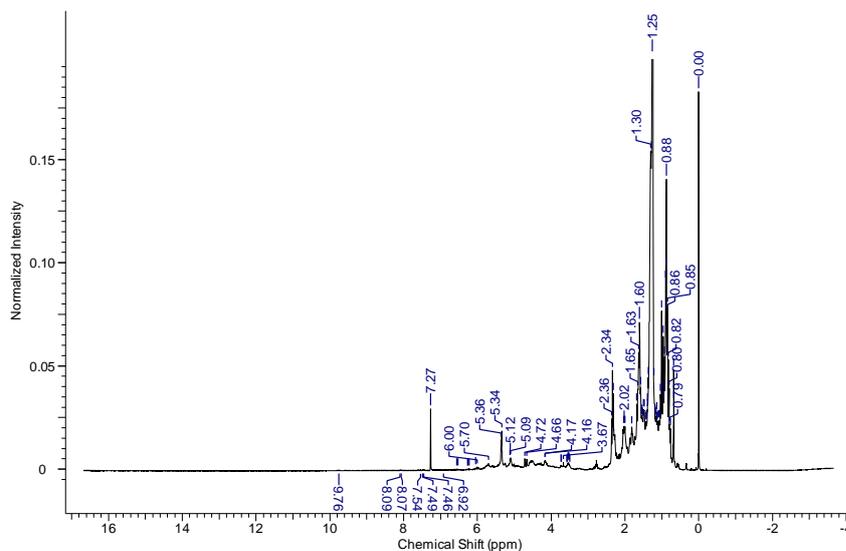
Ainda assim, as vantagens dessa produção *in vitro* são inúmeras, tais como a independência de fatores ambientais, menores danos ambientais associados à exploração de populações nativas, o aumento do controle da produção, o uso de linhagens celulares que garantam uma qualidade do produto, a viabilização econômica de produtos oriundos de espécies de difícil cultivo e a utilização de elicitores ou indutores no direcionamento da produção (KARUPPUSAMY, 2009). Além disso, é possível buscar melhores resultados otimizando o meio de cultura e as condições de cultivo. Murthy *et al.* (2014) descreve algumas estratégias para aumentar a produção de metabólitos secundários como por exemplo:

- a. Otimização do meio;
- b. Influência da fonte de carbono e suas concentrações;
- c. Influência da fonte de nitrogênio;
- d. Influência de nutrientes no meio de cultivo;
- e. Influência dos tipos e concentrações dos reguladores de crescimento;
- f. Influência da densidade do inóculo;
- g. Influência da temperatura;
- h. Influência da qualidade e intensidade da luz;
- i. Influência do pH no meio de cultivo;
- j. Influência da aeração e agitação do meio de cultivo, entre outras.

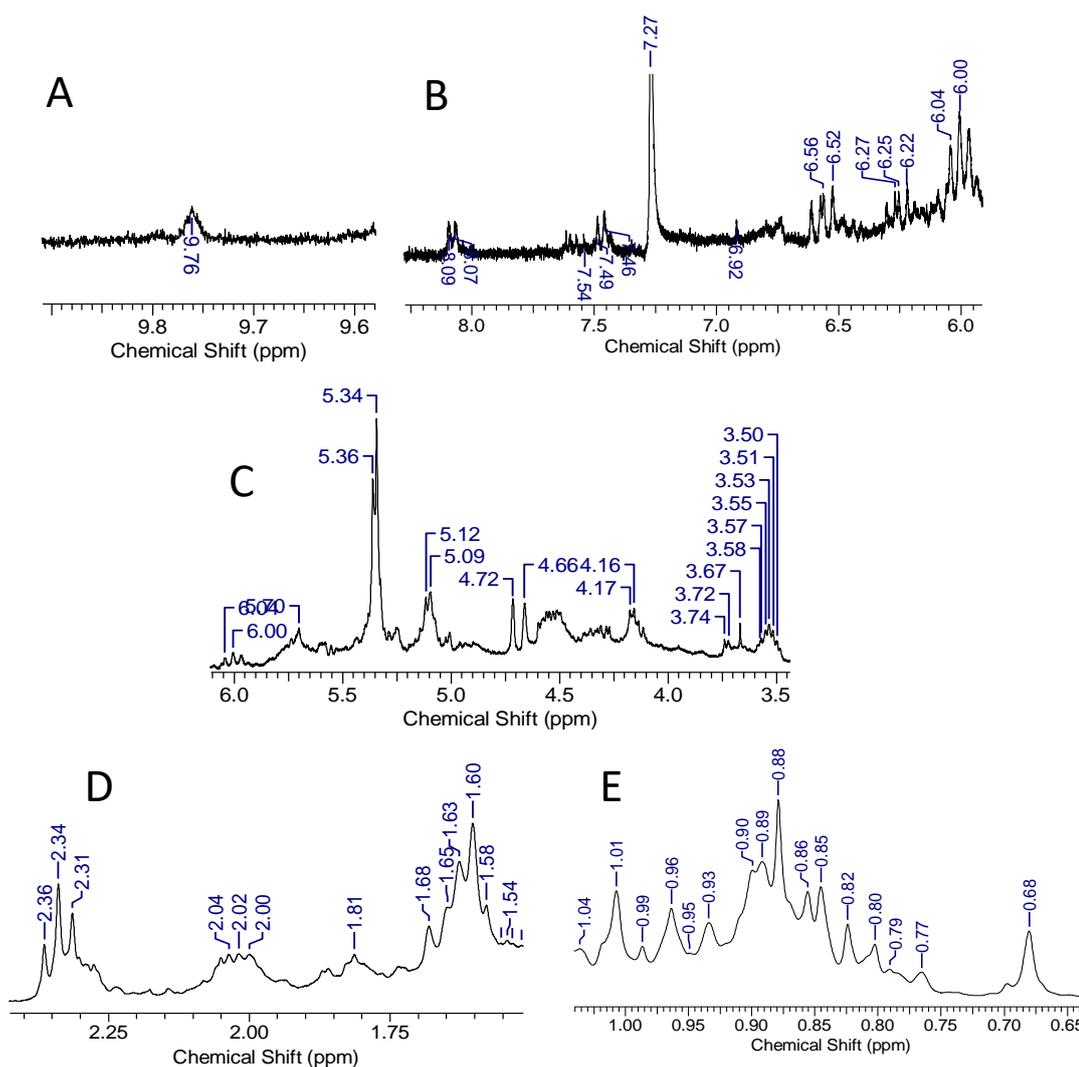
As CCDCs dos extratos e da fase (figura 9 e 10) apresentaram indícios da presença de terpenoides quando reveladas com  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  e anisaldeído sulfúrico devido a coloração roxa e lilás. As fluorescências visualizadas em luz UV  $\lambda$  254 e 365 nm indicam a presença de substâncias com duplas ligações conjugadas e/ou substâncias aromáticas. As placas foram reveladas também com  $\text{FeCl}_3$ , Reagente de Dragendorff e iodo e verificou-se a ausência de substâncias fenólicas e alcaloides ou simplesmente que essas substâncias se encontram em baixas concentrações.

Ao analisar os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos e fase (hexânico, AcOEt e fase AcOEt nas figuras 23, 25 e 27, respectivamente) foi possível observar alguns sinais característicos que sugerem a presença de substâncias de algumas classes químicas. O extrato hexânico (Figura 23) apresentou um sinal com baixa intensidade com deslocamento químico em  $\delta_{\text{H}}$  9,76, indicando a presença de um H de aldeído ou um H ligado a N de alguma classe de alcaloides (Figura 24.A), sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  8,1 e 6,0 característicos de H de anéis aromáticos (Figura 24.B), a região entre  $\delta_{\text{H}}$  6,0 e 3,5, indicando sinais característicos de H de duplas ligações isoladas (Figura 24.C), sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  2,39 e 1,55, característicos de H de  $-\text{CH}_2$  (Figura 24.D) e outros sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  1,0 e 0,68 característicos de metilas ( $-\text{CH}_3$ ) de terpenoides e/ou esteroides (Figura 24.E).

**Figura 23.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hexânico ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

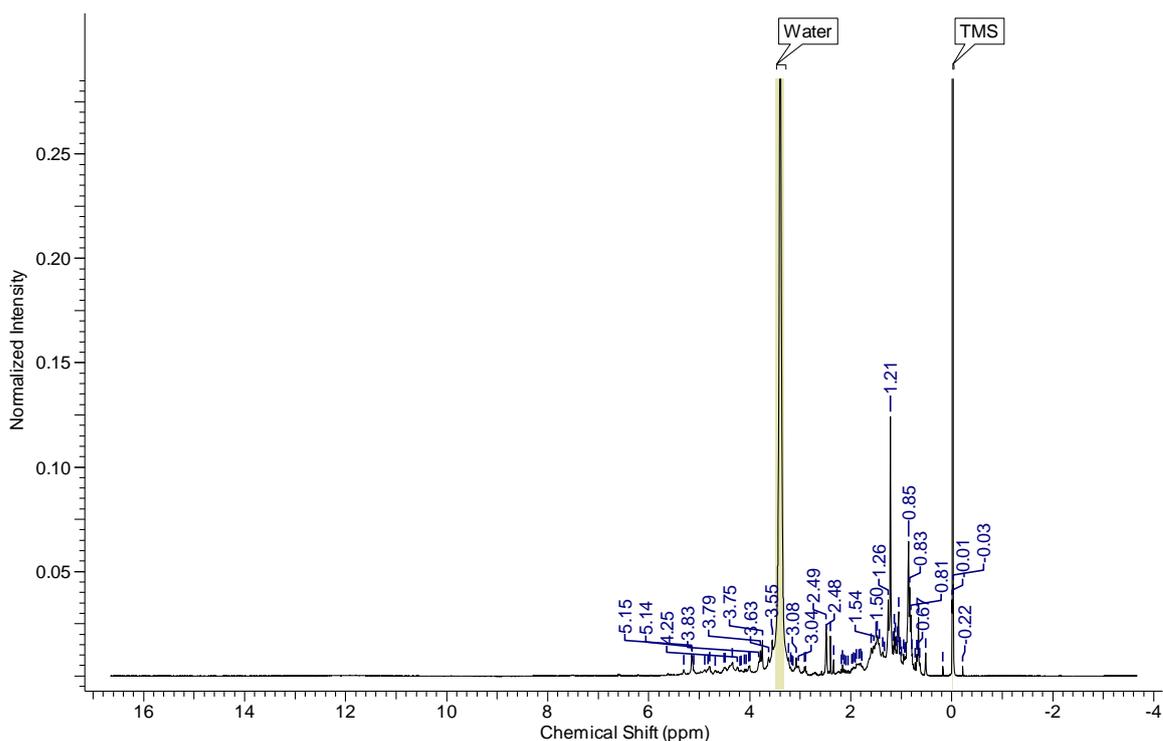


**Figura 24.** Expansões das regiões dos hidrogênios do extrato hexânico com os deslocamentos químicos. (A) Sinal em  $\delta_{\text{H}}$  9,76. (B) Região entre  $\delta_{\text{H}}$  8,3 a 6,0. (C) Região entre  $\delta_{\text{H}}$  6,0 a 3,5. (D) Região entre  $\delta_{\text{H}}$  2,39 e 1,55. (E) Região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,0 e 0,68 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

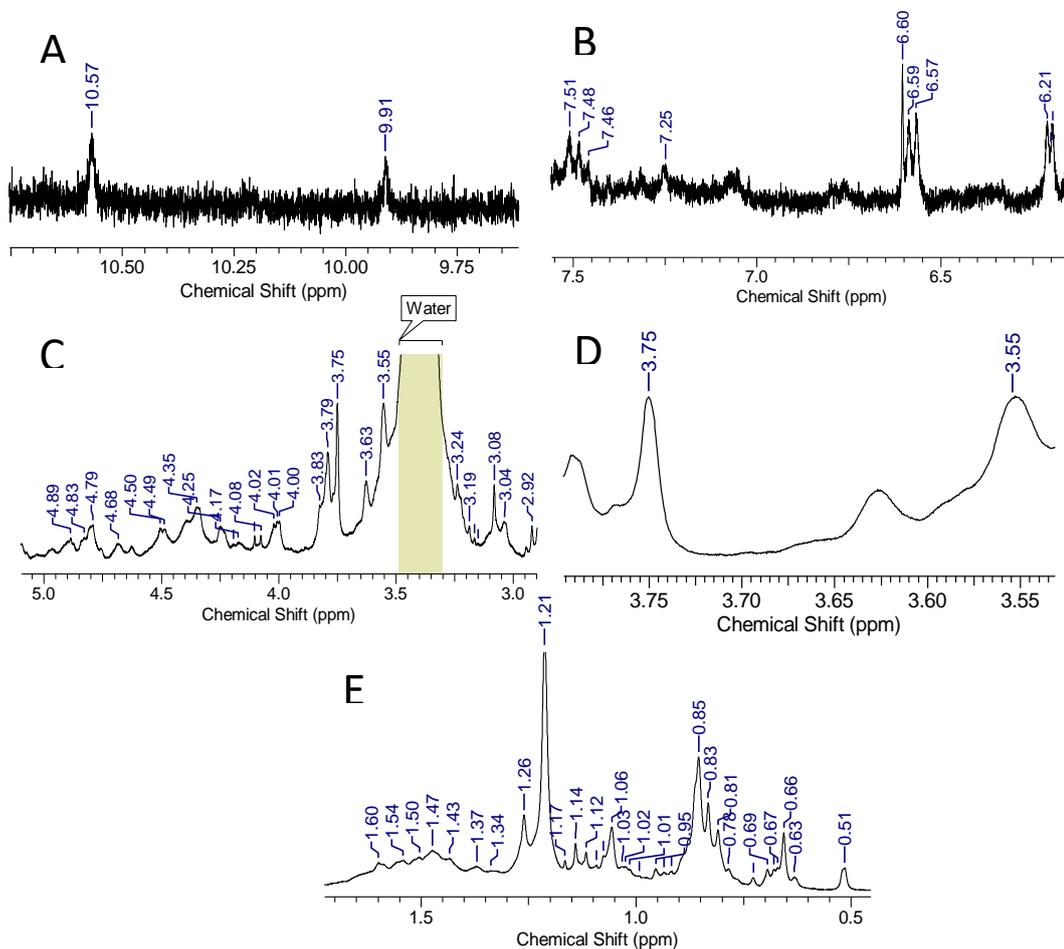


O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato AcOEt apresentou sinais com baixa intensidade em  $\delta_{\text{H}}$  10,57 característicos de ácidos carboxílicos e em  $\delta_{\text{H}}$  9,90 característicos de aldeídos ou de H de substâncias da classe de alcaloide (Figura 26.A). Presença de sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  7,50 e 6,57 e em  $\delta_{\text{H}}$  6,20, característicos de H de anéis aromáticos (Figura 26.B). Sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  5,15 e 2,92 e um duplete característicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,15 ( $J = 3$  Hz), indicativo de H de açúcares (Figura 26.C). Dois singletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,75 e 3,55, característicos de H de metoxilas (Figura 26.D). Sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  1,0 e 0,51 característicos de  $-\text{CH}_3$  de terpenos (triterpenos e esteroides) e os sinais característicos de alcanos de cadeias longas (“graxas”) em  $\delta_{\text{H}}$  1,21 ( $\text{CH}_2$ ) e 0,85 ( $\text{CH}_3$ ) (Figura 26.E).

**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato AcOEt (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).

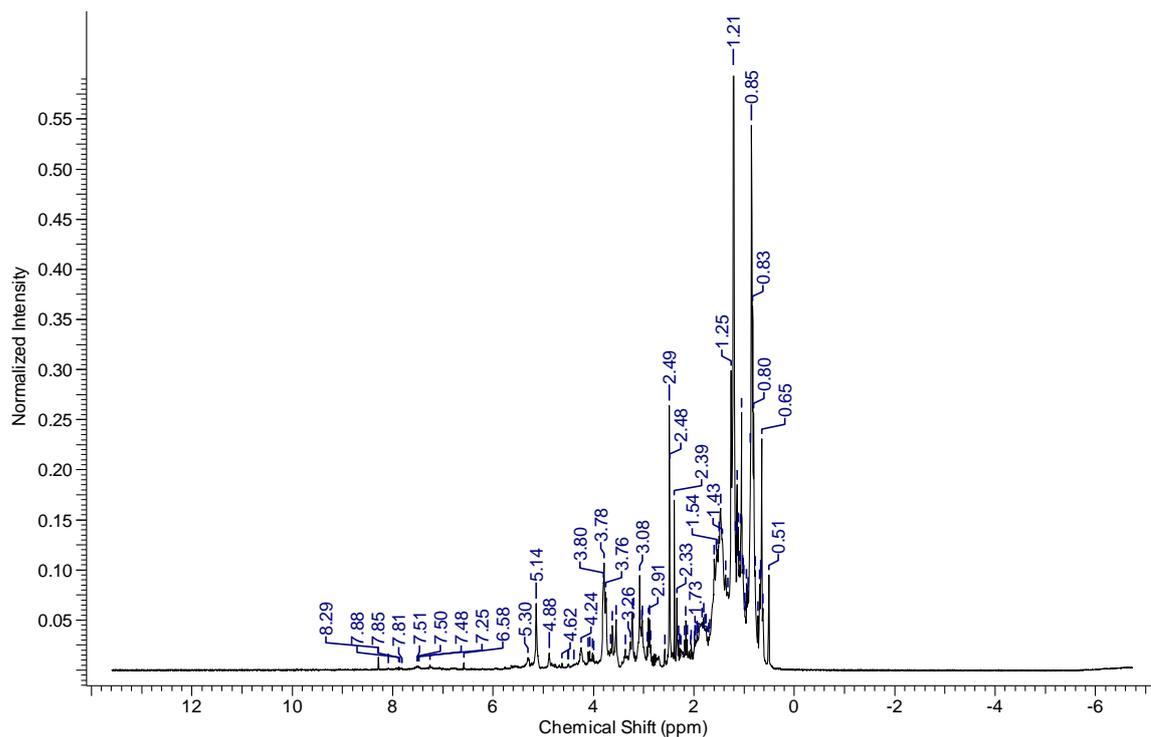


**Figura 26.** Expansões das regiões dos hidrogênios do extrato AcOEt. (A) Sinais em  $\delta_H$  10,57 e 9,90. (B) Região entre  $\delta_H$  7,50 e 6,20. (C) Região entre  $\delta_H$  5,15 e 2,94. (D) Dois H de (singletos) em  $\delta_H$  3,55 e 3,75. (E) Região entre  $\delta_H$  1,0 e 0,5 (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).

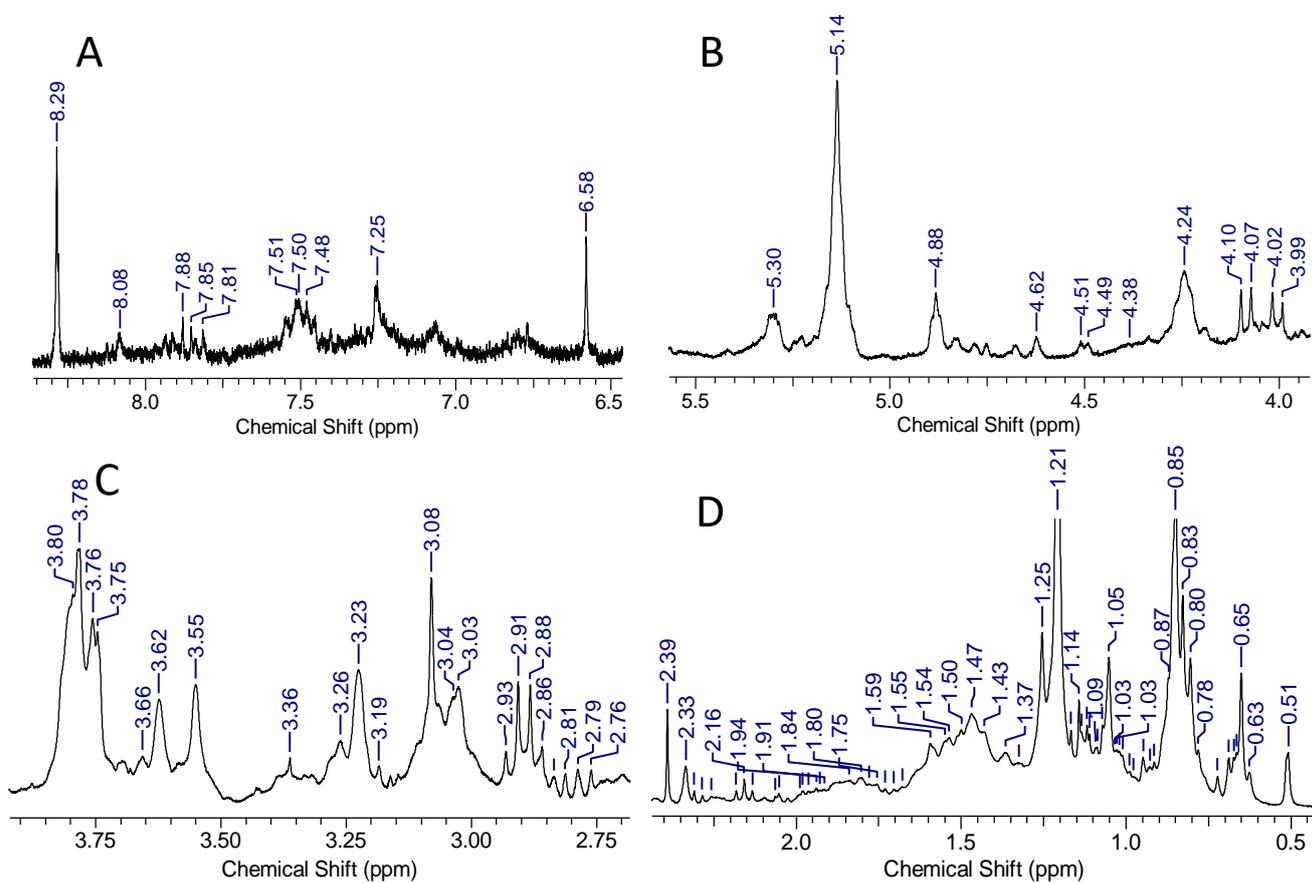


Por fim, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fase AcOEt (Figura 27) apresentou sinais fracos entre  $\delta_H$  8,29 e 6,58 característicos de H de anéis aromáticos (Figura 28.A). Presença de um duplete em  $\delta_H$  5,15 ( $J = 3$  Hz), indicativo de H anomérico de açúcares e outros sinais entre  $\delta_H$  4,90 e 3,00 (Figuras 28.B e 28.C). Sinais entre  $\delta_H$  1,0 e 0,51 característicos de  $-\text{CH}_3$  de terpenos (triterpenos e esteroides) e os sinais característicos de alcanos de cadeias longas (“graxas”) em  $\delta_H$  1,21 ( $\text{CH}_2$ ) e 0,85 ( $\text{CH}_3$ ) (Figura 28.D).

**Figura 27.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fase AcOEt (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



**Figura 28.** Expansões das regiões dos hidrogênios da fase AcOEt. (A) Região de  $\delta_{\text{H}}$  8,29 e 6,5. (B) Região de  $\delta_{\text{H}}$  5,5 e 4,0. (C) Região de  $\delta_{\text{H}}$  3,8 e 2,75. (D) Região de  $\delta_{\text{H}}$  0,5 e 2,40 (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



Analisando as CCDCs das frações obtidas do fracionamento do extrato hexânico, a fração 2 (6,3 mg) apresentou fluorescência muito fraca na lâmpada 254 nm e fluorescência mais intensa em 365 nm. Foi observada a coloração rosa e roxa nos reveladores anisaldeído e  $Ce(SO_4)_2$  (figura 11). Os sinais no espectro de RMN de  $^1H$  dessa fração demonstraram indícios da presença de esteroides, como a lupen-3-ona, porém, não foi dado prosseguimento a purificação e identificação devido à fração estar em uma mistura complexa e baixa massa.

A fração 9-11 (9,0 mg) apresentou fluorescência intensa em 254 nm e fraca em 365 nm, com um rastro formado pela retenção de moléculas. Na figura 12 é mostrada a CCDC das frações reveladas com  $Ce(SO_4)_2$ , onde foi observado a coloração rosa, em seguida a roxa. Na etapa de purificação em CLAE, foi coletado separadamente a fração 5 (1,0 mg), que se apresentou como um pico isolado com tempo de retenção de aproximadamente 11 minutos. Essa fração foi submetida à análise de RMN de  $^1H$ , porém não foi possível identificar a estrutura da substância devido à massa insuficiente da amostra.

A fração 27-30 (10,6 mg), selecionadas e reunidas após o fracionamento do extrato hexânico, apresentaram perfil similar nas placas de CCDC, relevando intensamente na luz UV 254 nm e na coloração azul com o revelador anisaldeído (Figura 13). Apesar de a amostra ter sido purificada em CLAE e repurificada utilizando o mesmo método em seguida, não foi possível obter uma substância isolada e realizar a identificação pelo espectro de RMN de  $^1H$  devido à baixa quantidade de amostra.

A partir das cromatoplasas de CCDC e dos sinais característicos na RMN de  $^1H$ , foi observado nos extratos, fases e frações o indício da presença de esteroides e terpenoides, em alta concentração, como por exemplo lupeol, sitosterol e estigmasterol. Os fitoesteróis são amplamente encontrados nas plantas e sua função está relacionada à capacidade de interferir na fluidez da membrana vegetal e na permeabilidade à água (BRUFAU, CANELA E RAFECAS, 2008). Além dos esteroides, foi observada a presença de açúcares e ácidos graxos nos extratos AcOEt e MeOH. Outras classes de substâncias podem estar presentes em pequenas quantidades.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As amostras testadas (extratos hexânico, AcOEt e aquoso e as fases AcOEt e MeOH/H<sub>2</sub>O), na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup>, não apresentaram atividade antioxidante nos ensaios realizados frente ao radical livre DPPH e ao complexo Fe<sup>3+</sup>/fenantrolina. A atividade antioxidante de uma amostra é considerada alta quando o valor da unidade de equivalência (mg de amostra/mg de ácido ascórbico) é próximo de 1 e, segundo os resultados observados na tabela 8, os valores de equivalência para todos os extratos testados foram altos, indicando a ausência da atividade.

**Tabela 8.** Resultados dos ensaios de atividade antioxidante frente ao DPPH e o e ao complexo Fe<sup>3+</sup>/fenantrolina, dos extratos,  $\pm$  desvio padrão.

<b>Extrato/fase</b>	<b>Valor de equivalência do teste com DPPH</b>	<b>Valor de equivalência do teste com F<sup>3+</sup>/fenantrolina</b>
Hexano	-102,35 $\pm$ 37,89	12,65 $\pm$ 1,808
AcOEt	-84,49 $\pm$ 10,75	22,76 $\pm$ 15,397
Fase AcOEt	-67,98 $\pm$ 10,78	18,60 $\pm$ 2,866
Fase MeOH/H <sub>2</sub> O	-103,30 $\pm$ 56,99	22,25 $\pm$ 2,033
H <sub>2</sub> O	-288,90 $\pm$ 375,68	13,52 $\pm$ 0,469

A atividade antioxidante de extratos vegetais pode estar relacionada com a presença de substâncias fenólicas que tem a capacidade de sequestrar radicais livres por possuírem hidroxilas fenólicas que atuam na captura desses radicais. A falta de atividade antioxidante dos extratos pode sugerir a ausência dessa classe de substâncias na composição química dos extratos ou apenas a presença de substâncias com atividade, porém em baixas quantidades, impossibilitando a observação do efeito.

## 5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIMICOBACTERIANA

Na avaliação da atividade antimicrobiana realizada no LABB, foram testados todos os extratos e fases, na concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup>, frente as bactérias

*Citrobacter freudii*, *Salmonella enterica* e *Enterobacter cloacae*. Os extratos não foram considerados ativos para nenhuma dessas cepas testadas. Souza (2016) testou os extratos dos calos de *D. saccifera* e detectou a atividade baixa/moderada para as mesmas cepas. Os sucessivos subcultivos dos calos é um fator que pode ocasionar a mudança da composição química, visto que as células apresentam a capacidade de alterar a síntese metabólica a partir de diferentes estímulos, originando produtos diferentes, tanto em composição quanto em quantidade.

O mesmo ensaio para determinação da concentração mínima inibitória (CIM) foi realizado pelo aluno Marcos Gabriel Maciel Salazar (membro do grupo de pesquisa) no NUPEMM/FURG (RS). Nesse caso, foram testados os extratos AcOEt e MeOH, ambos na concentração de 400 µg.mL<sup>-1</sup>, frente as bactérias *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*. Os extratos não foram considerados ativos para nenhuma dessas cepas testadas.

Segundo Pauli e colaboradores (2005), extratos vegetais podem apresentar substâncias ativas que sejam antagonizadas ou potencializadas na presença de outras. Além disso, as substâncias podem ser minoritárias e o seu efeito torna-se praticamente nulo ou inexistente. Esses resultados não inviabilizam o estudo para verificação do potencial antimicrobiano dos extratos de calo, visto que há uma ampla variedade de técnicas e alternativas capazes de induzir os resultados esperados.

Com relação à avaliação da atividade antimicrobiana frente à micobactéria *Mycobacterium tuberculosis*, foi determinado a CIM, a concentração inibitória para 90% da população bacteriana (IC<sub>90</sub>) e a concentração bactericida mínima (CBM). Os resultados, descritos na tabela 9, indicaram alta atividade do extrato AcOEt, visto que este apresentou a capacidade de inibir o crescimento bacteriano de acordo com os valores da CIM, IC<sub>90</sub> e CBM relativamente baixo obtidos. O extrato MeOH não foi considerado ativo.

**Tabela 9.** Determinação da CIM, IC<sub>90</sub> e CBM dos extratos AcOEt e MeOH e dois controles (antibióticos) frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

Extrato	CIM (µg.mL <sup>-1</sup> )	IC <sub>90</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	CBM (µg.mL <sup>-1</sup> )
AcOEt	≤25	19,5	200

MeOH	>400	-	>400
Rifampicina	≤0,01	-	-
insoniazida	0,03	-	-

Algumas espécies da família Rubiaceae já foram testadas em micobactérias, como por exemplo, a espécie *Duroia hirsuta* que foi ativa frente à *Mycobacterium phei* (LOPEZ *et al.*, 2001), *Psychotria vellosiana* que apresentou atividade frente a *M. tuberculosis* e *M. kansasii* (RAMOS *et al.*, 2008), e a espécie *Duroia macrophylla* ativa frente a *M. tuberculosis* (MARTINS *et al.*, 2014). Relatos na literatura demonstram que algumas plantas podem apresentar essas propriedades devido a moléculas de diferentes classes químicas como terpenoides, esteroides, alcaloides, flavonoides, entre outros (ADEBIYI *et al.*, 2015; SATYANARAYAN *et al.*, 2016).

Nas buscas realizadas na literatura, não foram encontrados trabalhos que relatam o isolamento de substâncias, com atividade frente a *M. tuberculosis*, a partir da cultura células e tecidos vegetais. Entretanto, calos cultivados *in vitro*, assim com outros tipos de cultura, tem a capacidade de fornecer metabólitos biologicamente ativos visto que as células vegetais têm a tendência de acumular esses metabólitos quando em determinadas condições fisiológicas e ambientais (ISAH *et al.*, 2017). Devido a esse potencial, o extrato AcOEt será fracionado em trabalho posterior.

#### 5.4 ESTABELECIMENTO E ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS

Com o estabelecimento dos calos de *Duroia saccifera* no trabalho realizado anteriormente por Souza (2016), foi possível constatar que a espécie apresenta uma resposta satisfatória tanto quanto à germinação *in vitro* de sementes quanto à indução e formação de calos. A rápida e intensa multiplicação dos calos associada à estabilidade representam uma boa opção e alternativa para o estabelecimento de um sistema de cultivo para obtenção e/ou indução de metabólitos secundários.

Sendo assim, o estabelecimento dos calos friáveis foi alcançado a partir da cultura de folhas de plântulas da espécie *Duroia saccifera* germinadas *in vitro*, no meio de cultura suplementado com 4 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D e 2 mg.L<sup>-1</sup> de KIN. Nesse

trabalho, foi realizada a avaliação da cinética de crescimento de células vegetais cultivadas em meio semissólido e em meio líquido, além de uma breve análise da composição química dos extratos obtidos de ambas as amostras das curvas.

#### 5.4.1 AVALIAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS CALOS FRIÁVEIS

Foi observado que ao longo dos sucessivos subcultivos os calos mantiveram-se sem alterações morfológicas visíveis, permanecendo com coloração esbranquiçada e aparência friável. A aferição da massa fresca e seca no período de 40 dias foi insuficiente. As massas frescas e secas aumentaram com o decorrer do tempo de cultivo, seguindo a mesma tendência.

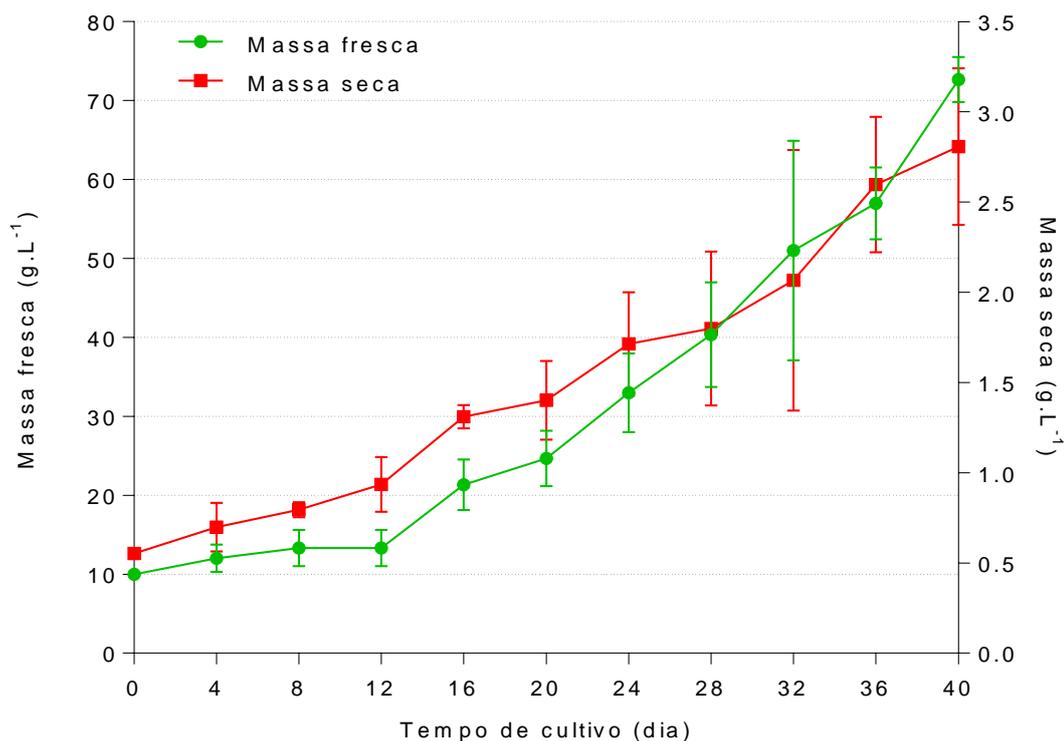
No 32º dia foi observada uma ampla oscilação no desvio padrão, isso é justificado devido às variações que uma cultura de células vegetais *in vitro* pode apresentar. Essas variações podem ser causadas por heterogeneidade fisiológica, instabilidade genética, crescimento lento da cultura *in vitro* e pela secreção de produto que poderia levar à baixa produção (de biomassa e também de substâncias). São fatores que precisam ser abordados para uma produção eficiente de um sistema de cultivo, sem impedimentos e prejuízos (SMETANSKA, 2008).

No 36º ao 40º dia de cultivo a massa fresca do calo aumentou de 5,7 g para 7,26 g, ao passo que a massa seca não acompanhou na mesma proporção o aumento, de 0,2596 g para 0,2808 g. Nesse período, as células aumentaram principalmente em teor de água, que é acumulada no interior das células. Isso acontece muito provavelmente devido à desaceleração na proliferação de células que é resultado da redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos e/ou a redução de O<sub>2</sub> no interior das células dos calos (SMITH, 1992). A taxa de multiplicação diminui a ponto de estabilizar e/ou iniciar o processo de morte celular. Essa oxidação foi observada pelo escurecimento dos calos a partir do 32º dia de cultivo.

Na figura 29 são apresentadas as massas frescas e secas, respectivamente, obtidas em intervalos de 4 dias durante os 40 dias de cultivo. No geral, a curva de crescimento dos calos tendeu ao padrão sigmoide, com particularidades a seguir indicadas. O crescimento dos calos em meio semissólido apresentou a fase lag do primeiro ao 12º dia de cultivo, onde o crescimento ocorreu lentamente. A fase de

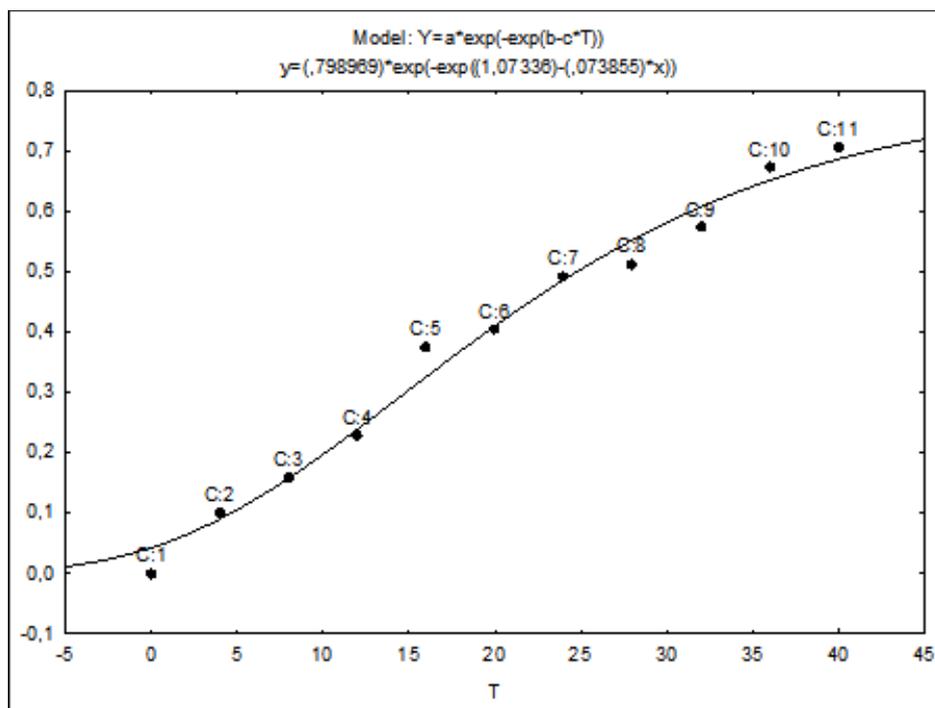
crescimento exponencial ocorreu do 12<sup>o</sup> ao 16<sup>o</sup> dia. A fase linear foi compreendida como sendo do 16<sup>o</sup> ao 40<sup>o</sup> dia. Tanto a fase de desaceleração quanto a fase estacionária não foram visíveis em relação a massa fresca e seca.

**Figura 29.** Curva de crescimento de calos de *Duroia saccifera* expressa em massa fresca e seca. Dados representados com a média  $\pm$  desvio padrão das triplicatas.



A curva obtida pelo modelo de Gompertz para a massa seca da curva de crescimento, encaixou no modelo matemático utilizado. Estatisticamente, o padrão sigmoide da curva foi observado e a equação foi descrita com coeficiente de correlação de  $R=0,9854$  (significativo a 5% de probabilidade). O valor de  $R$  foi bastante satisfatório e o modelo obtido na equação e as constantes descrevem bem a cinética de crescimento dos calos. Na figura 30, é descrita a curva obtida pelo modelo no programa Statistica 7. Os dados obtidos no experimento e mostrados na figura 29 anteriormente estão expressos em  $\text{g.L}^{-1}$  e para adaptar-se ao modelo foram transformados em logarítmicos.

**Figura 30.** Modelo matemático e curva obtidos pela aplicação do modelo estatístico de Gompertz para o crescimento dos calos de *D. saccifera*, em massa seca, ao longo de 40 dias de cultivo.



Pelo fato de que as fases de desaceleração, estacionária e/ou senescência (morte celular) não foram visíveis, o tempo estabelecido para a análise da curva foi insuficiente e precisa ser reavaliado para esclarecimentos futuros. A análise do crescimento do calo foi realizada para determinar os estágios de crescimento e, com o intuito de dar continuidade à cultura de calos de *D. saccifera*, o resultado obtido demonstra que no aspecto de acúmulo de biomassa, o tempo pode ser reavaliado para esclarecimento futuros.

Em comparação com outras espécies, o tempo de cultivo pode variar significativamente entre elas, como por exemplo *Byrsonima clauseniana* (Malpighiaceae) (SERRA *et al.*, 2000), *Bertholletia excelsa* (Lecythidaceae) (NOGUEIRA *et al.*, 2008), *Coffea arabica* (Rubiaceae) (SANTOS *et al.*, 2010), e *Acaciella angustissima* (Fabaceae) (ALONSO-HERRADA *et al.*, 2016), que apresentaram a curva de 100, 90, 60 e 45 dias, respectivamente. Zanca *et al.* (2016) estabeleceram a cultura de tecidos da espécie, do mesmo gênero, *Duroia macrophylla* onde o tempo para subcultivo dos calos era de 60 dias.

Além disso, a análise possibilitou conhecer e determinar as fases de desenvolvimento do calo para trabalhos posteriores de indução e obtenção de

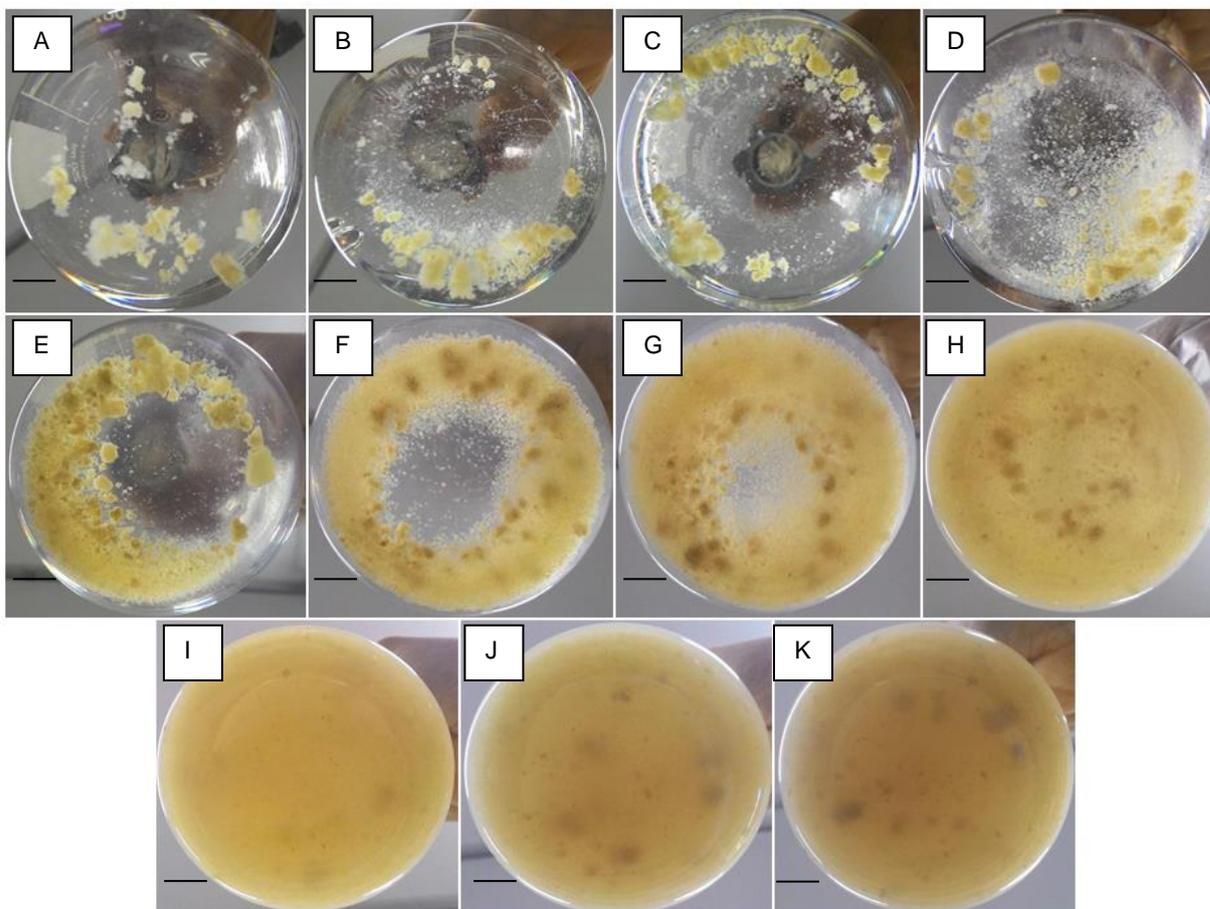
metabólitos, visto que é amplamente relatado na literatura o uso de cultura de calo para esta finalidade. Como por exemplo, Bharathi e Philomina (2010) relataram a produção de colchicina, um importante alcaloide altamente bioativo usado no tratamento de doenças crônicas como gota, em cultura de calos de *Gloriosa superba*, na presença de íons sulfato e nitrato de amônio, enfatizando a importância da otimização de nutrientes para alcançar maior produtividade.

#### 5.4.2 AVALIAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DA SUSPENSÃO CELULAR

Embora a raspagem dos calos seja uma prática comum para separar as células e facilitar a obtenção da cultura de células em suspensão, não foi necessário realizar esse procedimento. Isso porque, devido à friabilidade dos calos, as células foram facilmente liberadas no meio pela agitação dos frascos, o que permite obter células que, não sendo submetidas ao estresse mecânico associado à raspagem, possuem altos níveis de viabilidade e divisão celular.

A cultura de células em suspensão de *Duroia saccifera* foi estabelecida a partir da transferência dos calos para o meio de cultura sem a adição de ágar. A cultura foi mantida em agitador rotativo. Os resultados foram satisfatórios visto que houve um crescimento progressivo muito rápido das células ao longo dos 40 dias de cultivo. A coloração mais embranquiçada permaneceu até o 28º dia, após isso a cultura apresentou um escurecimento gradativo. A partir do 32º dia foi notório que a suspensão celular iniciou um processo de oxidação devido à alteração da coloração (figura 31).

**Figura 31.** Desenvolvimento de suspensões celulares de *Duroia saccifera*, durante 40 dias de cultivo.



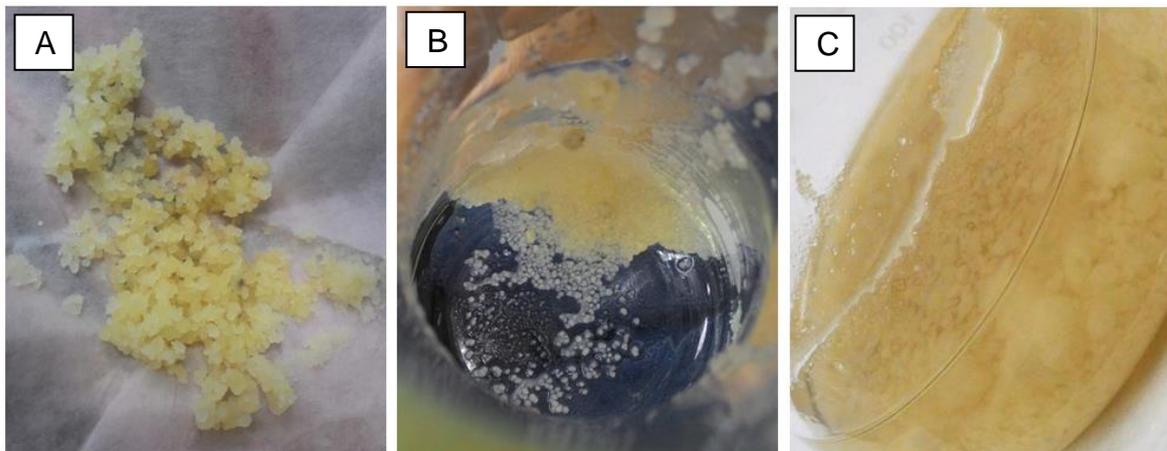
Legenda: (A) Primeiro dia de inoculação; (B) 4º dia; (C) 8º dia; (D) 12º dia; (E) 16º dia; (F) 20º dia; (G) 24º dia; (H) 28º dia; (I) 32º dia (observar a alteração na coloração a partir deste dia); (J) 36º dia; (K) 40º dia. Barra = 1 cm.

A inoculação do calo em meio líquido sob agitação, desencadeou a separação de células e, posteriormente, a formação de aglomerados celulares. Na figura 32 observa-se que no 32º dia de inoculação esses aglomerados celulares eram relativamente grandes (formando pequenos calos), sendo facilmente separados entre si. Essa tendência é esperada em cultura de células em suspensão devido à dificuldade das células para se separarem após a divisão. A secreção de polissacarídeos extracelulares pode ainda contribuir para aumentar essa adesão entre as células. Mesmo a cultura de suspensão fina consiste em colônias compostas por cerca de 5-200 células e esse grau de agregação celular é aceitável.

Brodelius (1985) explica que as culturas de células em suspensão crescem mais frequentemente em agregados celulares de vários tamanhos. As células no

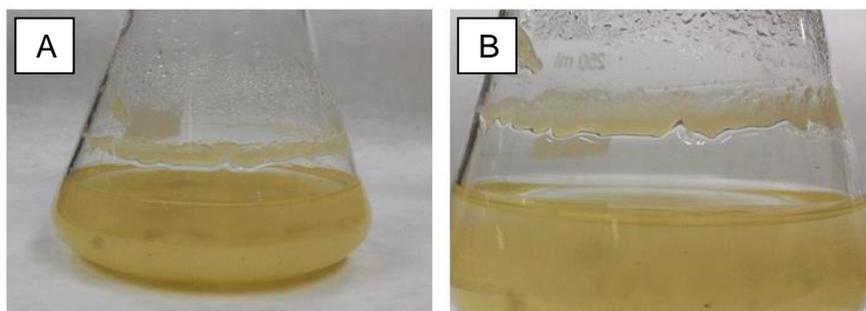
centro de um agregado macroscópico são expostas a um ambiente diferente do que as células na superfície, esse processo é resultado da limitação da transferência de massa. Por esse motivo, pode-se esperar que as células em diferentes partes do mesmo agregado se comportem de maneira diferente, sendo necessário manter a(s) cultura(s) o mais homogênea possível.

**Figura 32.** Detalhes das suspensões celulares de *Duroia saccifera*, no 32º dia de cultivo.



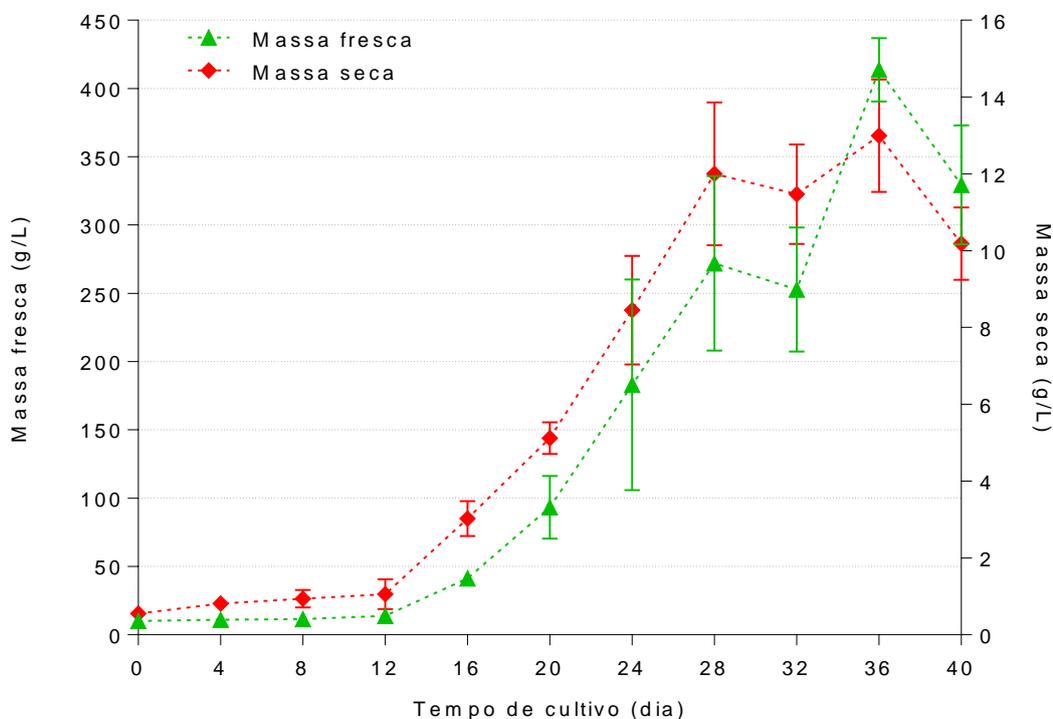
Além disso, as culturas apresentaram a formação de uma “placa celular” na parede dos erlenmeyers, na marca demarcada pela agitação rotativa dos frascos (figura 33). Esse efeito é esperado devido ao acúmulo de células à medida em que a suspensão celular aumenta a quantidade de células no meio. Essa placa se desprendia facilmente da parede do erlenmeyer e era diluída no meio.

**Figura 33.** Detalhe da suspensão celular de *Duroia saccifera*, no 24º dia de cultivo.



A curva de crescimento da suspensão celular foi avaliada em 40 dias de cultivo (figura 34). A fase lag ocorreu do primeiro dia de inoculação até o 12º dia. A fase lag pode ser considerada como uma fase produtora de energia onde as células preparam-se para divisão celular (SHIMIZU *et al.*, 1977). Já a fase de crescimento exponencial ocorreu do 12º ao 20º dia de cultivo da suspensão celular. Segundo Shimizu *et al.* (1977) esta fase é caracterizada como a fase biossintética onde ocorre a máxima divisão celular.

**Figura 34.** Curva de crescimento de suspensões celulares de *D. saccifera* (massa fresca e seca).

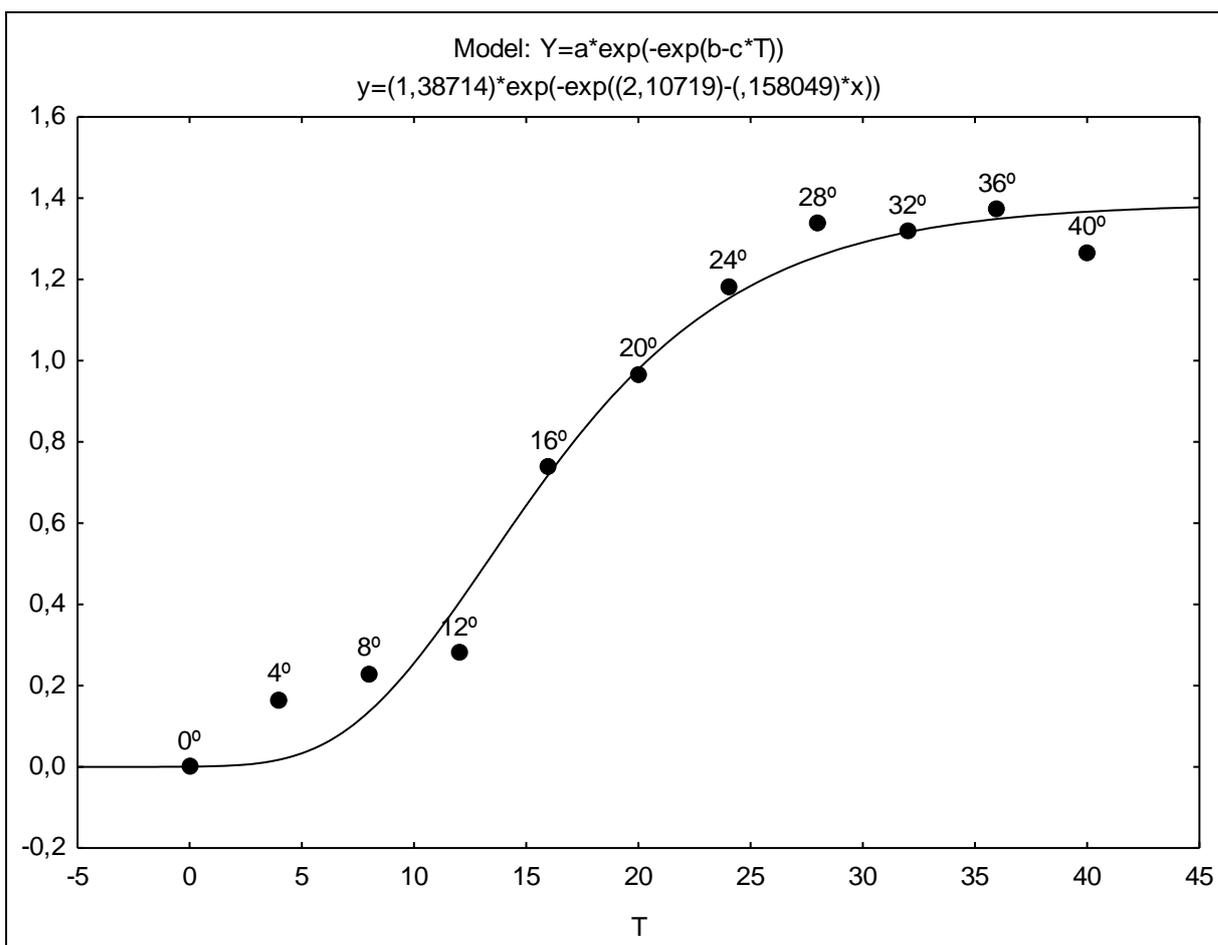


A fase linear foi considerada do 20º ao 28º dia. Na fase de crescimento linear a divisão celular diminui e as células crescem (SMITH, 1992). Do 28º para o 32º dia foi observado uma diminuição significativa em massa fresca. Em seguida, do 32º ao 36º dia houve um aumento abrupto na biomassa fresca. A massa em cada intervalo, em  $g.L^{-1}$ , respectivamente foi de 271,92, 252,77 e 413,70.

Aplicando a curva de crescimento da suspensão celular no modelo de Gompertz, para a massa seca, ocorreu o encaixe dos dados ao modelo matemático,

apesar dos valores “não esperados” no 32º dia de cultivo. Estatisticamente, o padrão sigmoide da curva foi observado e a equação foi descrita com coeficiente de correlação de  $R^2=0,9778$  (significativo a 5% de probabilidade). Na figura 35, é descrita a curva obtida pelo modelo no programa Statistica 7.

**Figura 35.** Modelo matemático e curva obtidos pela aplicação do modelo estatístico de Gompertz para o crescimento da suspensão celular de *D. saccifera*, em massa seca, ao longo de 40 dias de cultivo.



Sendo assim, a fase de desaceleração foi compreendida como sendo uma faixa entre 20º o 24º dia. As culturas nesse período de desaceleração devem ser transferidas para um meio fresco devido à redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos e a redução de  $O_2$  no interior das células e calos (SMITH, 1992).

A fase estacionária foi compreendida do 24º ao 36º dia de cultivo, seguido pela fase de senescência celular até o 40º dia analisado. Após o período de crescimento, as células entram na fase estacionária onde há um maior número de

células com menor capacidade de divisão celular e a célula entra em estágio de diferenciação celular. Nessa fase, geralmente ocorre o maior acúmulo de metabólitos secundários, porém com menor crescimento celular.

A presença da fase de morte celular é comum em culturas de células vegetais. No presente experimento, esse comportamento provavelmente está associado ao estado fisiológico do inóculo. A diminuição provavelmente aconteceu porque houve um esgotamento dos nutrientes do meio, além da menor área e disponibilidade de oxigênio para o crescimento e as trocas gasosas das células.

Foi observado um crescimento de 40 vezes da cultura. Bona *et al.* (2012) também observou um crescimento de 40 vezes dos calos de *Lavandula angustifolia* em três semanas, constatando que a troca de meio de cultura a cada 3 semanas seria mais adequada para manter o crescimento da fase logarítmica. O conhecimento sobre a curva de crescimento da suspensão celular é importante para a manutenção do crescimento logarítmico e deve ser determinado um protocolo específico para cada espécie.

O crescimento das culturas de células em suspensão avaliado nesse trabalho foi feito com base em metodologias que demonstram o estabelecimento das culturas e a cinética de crescimento, além disso foi conduzido em condições controladas, em triplicata e a retirada era feita de forma aleatória. Inicialmente as células dividem-se lentamente (fase lag), posteriormente ocorrem fases de rápido crescimento (exponencial e linear) e por fim, as células tendem a taxas menores de divisão (fase de desaceleração e estacionária) até o estágio de morte celular.

Normalmente, o padrão de crescimento observado em cultura de células vegetais segue esse padrão sigmoide. Esse tipo de curva de crescimento já foi observado em outras espécies de plantas lenhosas de uso medicinal como a japecanga (*Smilax goyazana*) (SANTOS *et al.*, 2007), copaíba (*Copaifera langsdorffii*) (AZEVEDO, 2003b), sangra d'água (*Croton urucurana*) (LIMA *et al.*, 2007), murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*) (NOGUEIRA *et al.*, 2007), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) (CASTRO *et al.*, 2008) e aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva*) (VASCONCELOS *et al.*, 2012).

Na curva de crescimento da suspensão celular de *Psychotria carthagenensis* (Fabaceae) foi observada a fase lag até o 5º dia de cultivo. Em seguida, a fase linear

ocorreu do 5<sup>o</sup> ao 12<sup>o</sup> dia e a fase estacionária do 12<sup>o</sup> ao 18<sup>o</sup> dia. Após esse intervalo a massa fresca e seca diminuiu gradativamente até o fim do experimento (LOPES *et al.*, 2000).

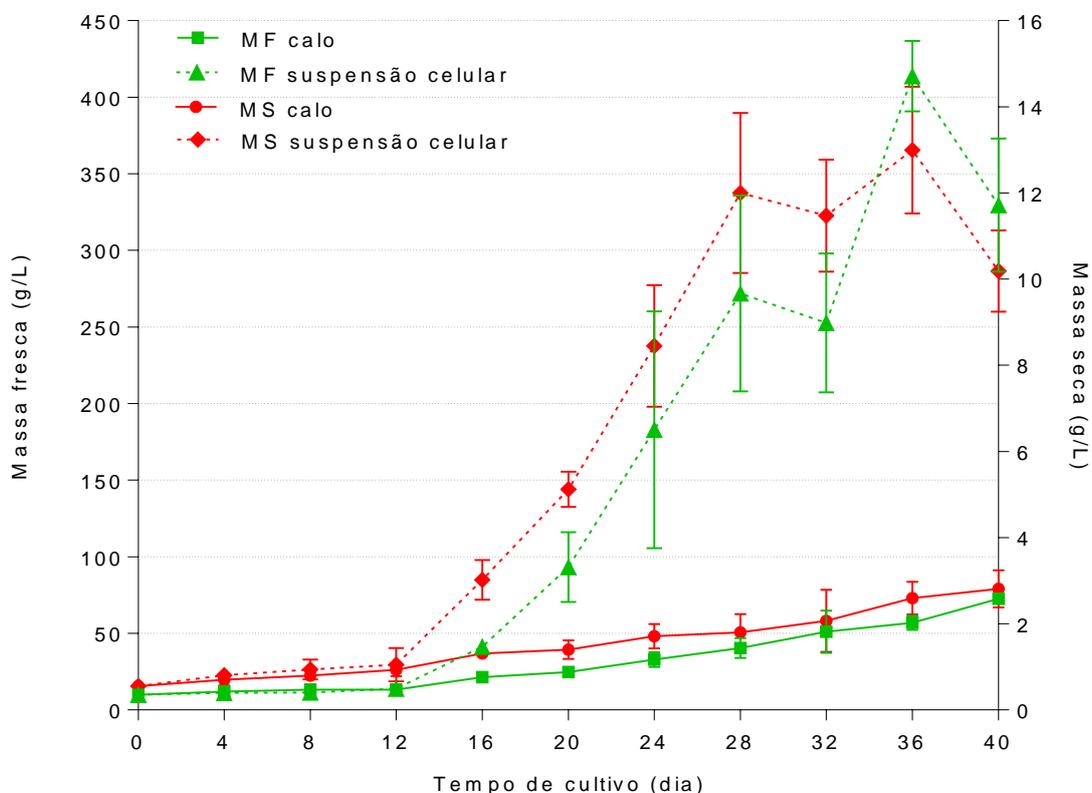
Pelo fato de ter sido atingido uma cultura de calos com alto grau de friabilidade no estudo de Souza (2016), a cultura de células em suspensão foi estabelecida com sucesso no presente trabalho. As culturas podem ser mantidas por longos ciclos de subcultivo devido as altas taxas de crescimento, multiplicando-se exponencialmente em biomassa fresca e seca. Sendo assim, não foram necessárias otimizações nos componentes do meio ou condições ambientais para o estabelecimento das culturas em meio líquido.

A espécie *Duroia saccifera* se mostrou uma excelente alternativa como fonte de culturas de tecidos e células por ter proporcionado, até o presente momento, resultados satisfatórios na formação de calos friáveis e suspensões celulares homogêneas. Estudos subsequentes a este serão conduzidos com intuito de promover o aprofundamento nas técnicas de elicitação, a fim de alcançar o isolamento e a identificação de substâncias biologicamente ativas a partir de tecidos e células vegetais cultivados *in vitro*.

#### 5.4.3 COMPARAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO ENTRE AS CULTURAS DE CALO E SUSPENSÃO CELULAR

Em análise comparativa entre a cinética de crescimento das culturas de calo e suspensão celular de *D. saccifera*, o crescimento em biomassa fresca e seca da suspensão foi expressivamente maior (figura 36). A velocidade de multiplicação celular é maior devido às condições de cultivo em meio líquido. Szabados e colaboradores (1991) relatam que isso se deve ao fato de que as células em suspensão estão em contato direto com os nutrientes no meio, facilitando os processos metabólicos. Além disso a constante agitação e aeração do meio aumenta a disponibilidade de oxigênio evitando a formação de gradientes químicos, entre outras.

**Figura 36.** Comparação das curvas de crescimento (em massa fresca) de calo e de suspensões celulares de *D. saccifera*, durante 40 dias de cultivo.



A Tabela 10 resume os valores dos parâmetros calculados para a cinética de crescimento de ambas as formas de crescimento. O índice de crescimento (I.C.) da cultura de células em suspensão foi 4,2 vezes superior ao dos calos. A taxa de crescimento específico máxima ou velocidade máxima específica ( $\mu_{max}$ ) foi 3,71 vezes maior para a suspensão celular em relação ao calo. O tempo de latência ( $\lambda$ ) da suspensão foi sete vezes maior do que do calo, demonstrando que, segundo o modelo estatístico, a fase lag do calo foi de apenas um dia aproximadamente. O tempo de regeneração das células (G) foi maior para os calos, visto que são necessários mais dias devido ao crescimento mais lento. Além disso, coeficiente de determinação indica um bom “encaixe” estatístico, com nível de significância aceitável e confiável entre os resultados observado e preditos.

**Tabela 10.** Comparação dos parâmetros cinéticos entre a cultura de calos e células em suspensão.

Parâmetros	Calo	Suspensão celular
I.C.	4,0876	17,4505
$\mu_{\max}$ (d <sup>-1</sup> )	0,0590	0,2192
$\lambda$ (dia)	0,9932	7,0053
G (dia)	5,1015	3,1616
R <sub>2</sub> (%)	98,54	97,78

Legenda: I.C. = índice de crescimento.  $\mu_{\max}$  = velocidade máxima específica.  $\lambda$  = tempo de latência. G = tempo de regeneração das células. R<sub>2</sub> = coeficiente de correlação.

A tabela 11 relaciona esses parâmetros relatados para a cultura de células em suspensão de outras espécies de plantas usadas para a indução e produção de metabólitos secundários e proteínas terapêuticas. Observa-se que as suspensões de *D. saccifera* atingiram, nas condições de cultura utilizadas nesse estudo, velocidade máxima específica consideravelmente alta, tornando-se um valioso sistema de cultivo para obtenção de moléculas bioativas.

**Tabela 11.** Taxas máximas de crescimento específico e índice de crescimento de cultura de células em suspensão de diferentes espécies, relatados na literatura. (adaptado de Nova-López *et al.*, 2017).

Espécie	Produto	I.C.	$\mu_{\max}$ (d <sup>-1</sup> )	Referência
<i>Nicotiana tabacum</i>	Fosfatase alcalina, lactoferrina	10,0-19,0	0,43-1,1	Becerra-Arteaga <i>et al.</i> , 2006, Choi <i>et al.</i> , 2003
<i>Taxus chinensis</i>	Taxol	0,22	0,12	Dong e Zhong, 2002
<i>Oryza sativa</i>	Butirilcolinesterase humana	7,1-21,8	0,15-0,24	Corbin <i>et al.</i> , 2016
<i>Thevetia peruviana</i>	peruvosideo	2,1-3,2	0,17	Zabala <i>et al.</i> , 2009
<i>Solanum tuberosum</i>	Proteína Cry 1Ac	4,8-17,6	0,12	Nova-López <i>et al.</i> , 2017

Stella e Braga (2002) realizaram o estudo do crescimento de calos e células em suspensão da espécie *Rudgea jasminoides*, da família Rubiaceae (lenhosa), a fim de estabelecer um sistema útil para a indução e obtenção de fitoalexinas em resposta a elicitação por inóculo fúngico. Para os calos, foi verificado o aumento de 4,5 e 5 vezes (MF e MS, respectivamente) da massa durante 60 dias, ao passo que para a suspensão celular foi observado o aumento de 8 e 11 vezes (MF e MS, respectivamente) durante 15 dias. A suspensão foi facilmente estabelecida e apresentou uma alta taxa de crescimento. No caso, essa espécie fornece um sistema útil para o estudo da composição da parede celular de plantas e realizar a análise de metabólitos secundários defensivos produzidos (fitoalexinas).

Lopes e colaboradores (2000) relataram o estudo da cinética de crescimento das culturas de calo e suspensão de células de *Psychotria carthagenensis* (Fabaceae). As curvas de crescimento das culturas foram estabelecidas em 30 dias. A taxa de crescimento específica máxima ( $\mu_{max}$ ) da suspensão foi de  $0,099\text{ d}^{-1}$ . Em comparação com a espécie *D. saccifera*, foi maior que a taxa obtida pelo calo de  $0,059\text{ d}^{-1}$ , mas muito menor que a taxa obtida pela suspensão de  $0,2192\text{ d}^{-1}$ .

## 5.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CULTURA DE CALOS E CÉLULAS EM SUSPENSÃO

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem ser sintetizados em cultivo de células de plantas *in vitro*, que em alguns casos mostra-se como um sistema comercialmente mais viável onde os níveis de rendimento são ligeiramente ou expressivamente mais elevados. Um exemplo disso é a produção de geraniol, um importante monoterpenoide para indústrias de alimentos e fragrâncias (CHEN E VILJOEN, 2010).

A indução e a produção podem ser feitas diretamente da espécie na qual foi feito o isolamento ou indiretamente utilizando um sistema de cultivo estabelecido com outra espécie. Diversos grupos de pesquisa têm relatado a produção de taxol em cultura de células de diferentes espécies do gênero *Taxus*. O gênero é conhecido por possuir alcaloides diterpênicos, particularmente o taxol (vendido comercialmente como o medicamento genérico paclitaxel) que é utilizado em larga escala para o tratamento de doenças crônicas como câncer. Espécies como *Taxus*

*baccata*, *T. cuspidata*, *T. chinensis*, *T. canadenses*, *T. media*. *T. globosa* entre outras são estudadas (ZHONG, 2002), além da própria espécie *T. brevifolia*, que é a principal fonte do taxol e a primeira espécie na qual ele foi isolado em 1971 por Wani e colaboradores. A capacidade das espécies do gênero *Taxus* de produzir taxol e seus derivados depende muito mais das condições da cultura e do emprego de elicitores químicos, físicos e biológicos do que das espécies de plantas utilizadas (ZHONG, 2002).

Utilizando um meio de cultura adequado e condições ótimas de cultivo, na teoria, é possível estabelecer a cultura *in vitro* de qualquer espécie de planta. A escolha, porém, é feita quando se trata de uma espécie com a presença ou indicativos da presença de produtos naturais química e/ou biologicamente relevantes. Nesse trabalho, o estudo da espécie *D. saccifera* corrobora com as evidências relatadas em trabalhos anteriores com espécies da família Rubiaceae, do gênero *Duroia* e da própria espécie.

Foram realizadas as análises químicas preliminares dos extratos hexânico e acetato de etila dos calos e das suspensões celulares para verificar o comportamento da produção de metabólitos ao longo do tempo de cultivo. Inicialmente, foi possível observar que o aumento das massas dos extratos acompanhou o aumento das massas secas dos calos ao longo dos 40 dias de cultivo (tabela 12). Os rendimentos mantiveram-se sem oscilação drástica.

**Tabela 12.** Massa e rendimento dos extratos hexano e acetato de etila obtidos das amostras referente ao crescimento da cultura de calos de *D. saccifera* em meio semissólido.

Amostra	Massa (g)	Extrato hexânico		Extrato AcOEt	
		Massa (mg)	Rendimento (%)	Massa (mg)	Rendimento (%)
T. z.	0,1389	1,2	0,864	3,8	2,736
4º dia	0,2037	1,5	0,736	2,8	1,375
8º dia	0,2032	1,1	0,541	2,9	1,427
12º dia	0,2258	0	0	3,5	1,550
16º dia	0,3682	2,9	0,788	5,4	1,467
20º dia	0,4104	2,5	0,609	5,5	1,340
24º dia	0,501	3,0	0,599	-	-

Continuação					
28º dia	0,573	3,8	0,663	5,4	0,942
32º dia	0,614	3,6	0,586	6,9	1,124
36º dia	0,698	3,9	0,559	8,9	1,275
40º dia	0,7923	4,9	0,618	8,4	1,060

T. z.: tempo zero (inicial).

-: extrato não obtido.

As massas obtidas dos extratos hexânico e AcOEt das suspensões celulares foi claramente maior (tabela 13) e o aumento das massas dos extratos também acompanhou o aumento das massas secas das suspensões. Em relação ao extrato hexânico e AcOEt, as suspensões mostraram-se até 5,6 e 2,8 vezes mais produtivas, respectivamente. Os rendimentos dos extratos oscilaram ao longo dos intervalos do tempo de cultivo, possibilitando observar a diminuição da massa e do rendimento nos últimos dias da cultura de células em suspensão.

**Tabela 13.** Massa e rendimento dos extratos hexano e acetato de etila obtidos das amostras referente ao crescimento da cultura de células em suspensão de *D. saccifera* em meio líquido.

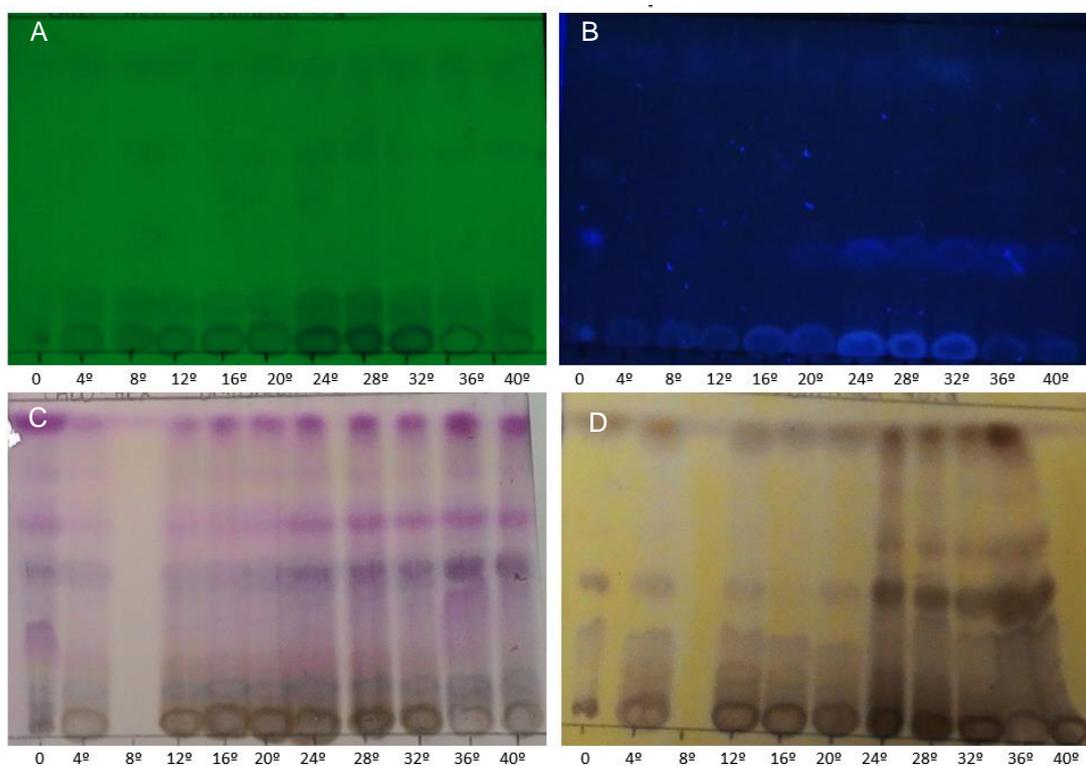
Amostra	Massa (g)	Extrato hexânico		Extrato AcOEt	
		Massa (mg)	Rendimento (%)	Massa (mg)	Rendimento (%)
T. z.	0,1389	1,2	0,864	3,8	2,736
4º dia	0,2306	1,9	0,824	3,3	1,431
8º dia	0,2532	1,4	0,553	2,8	1,106
12º dia	0,2889	3,2	1,108	3,1	1,073
16º dia	0,8518	8,2	0,963	6,5	0,763
20º dia	1,4606	16,1	1,102	18,2	1,246
24º dia	2,5346	27,4	1,081	25,7	1,014
28º dia	3,4498	20,3	0,588	-	-
32º dia	3,2821	-	-	23,5	0,716
36º dia	3,9986	27,8	0,695	24,7	0,618
40º dia	3,0033	13,0	0,433	14,3	0,476

T. z.: tempo zero (inicial).

-: extrato não obtido.

Na figura 37, são mostradas as CCDCs dos extratos hexânicos dos calos. Nas placas A e B foram observadas bandas com baixa intensidade de fluorescência. Na placa C foi observado a coloração rosa, roxa e azul, indicando a presença de esteroides, terpenoides e iridoides, respectivamente. É possível notar o aumento e diminuição gradual na concentração de algumas substâncias ao longo do tempo de cultivo. Além disso, não houve o aparecimento de nenhum metabólito novo, sendo a composição química bastante constante ao longo do tempo.

**Figura 37.** CCDC dos extratos hexânicos das amostras da curva de crescimento dos calos eluídos com DCM/MeOH 98:2.

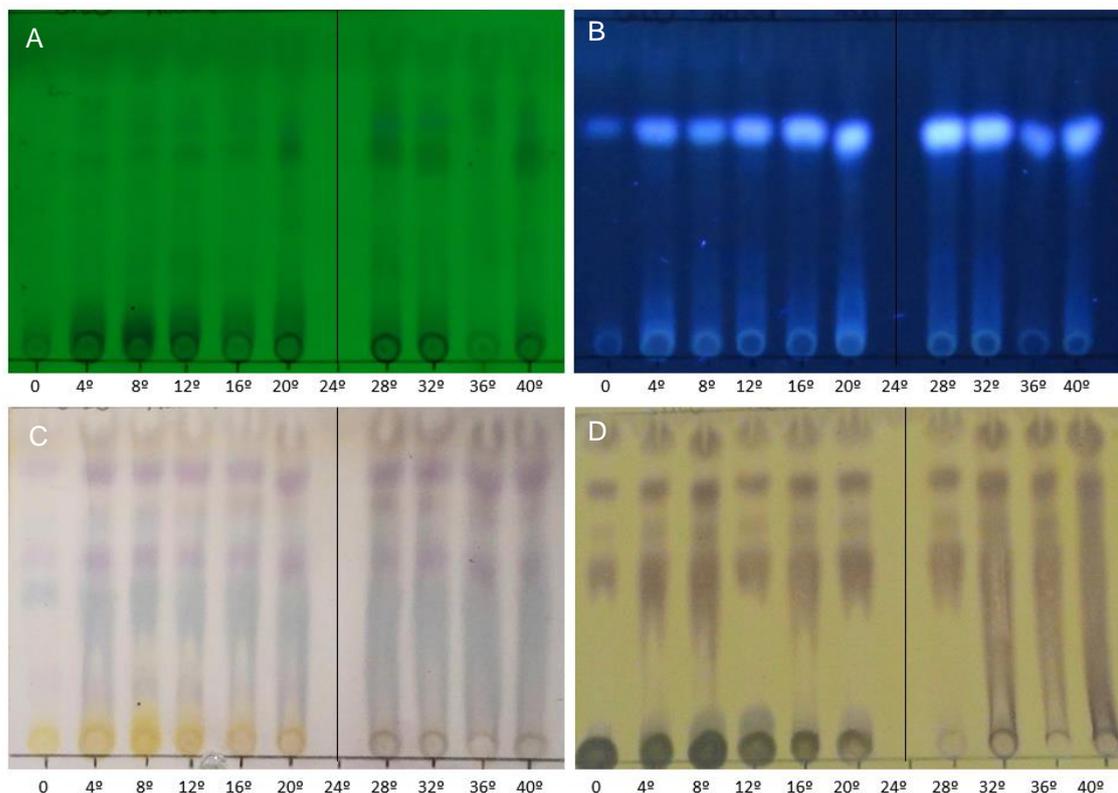


Legenda: A: 264 nm. B: 365nm. C: anisaldeído sulfúrico. D:  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ .

Já na figura 38 são mostradas as CCDCs dos extratos AcOEt dos calos. Foi observado em A e B a presença de substâncias com fluorescência intensa, principalmente na luz UV 365 nm. Na placa C, as colorações predominantes foram roxo e azul, em diferentes tempos de retenção, indicando a possível presença de terpenoides e esteroides, respectivamente. No ponto da origem, onde foram aplicadas as amostras, até o 20º dia de cultivo, foi notada a presença de uma classe de substâncias que revelou amarelo. O desaparecimento dessa classe pode estar associado ao seu consumo pela própria célula. Nas placas é observado também um

aumento gradativo na concentração de moléculas dos extratos devido ao “rastros” formado pela retenção das moléculas durante a eluição das placas.

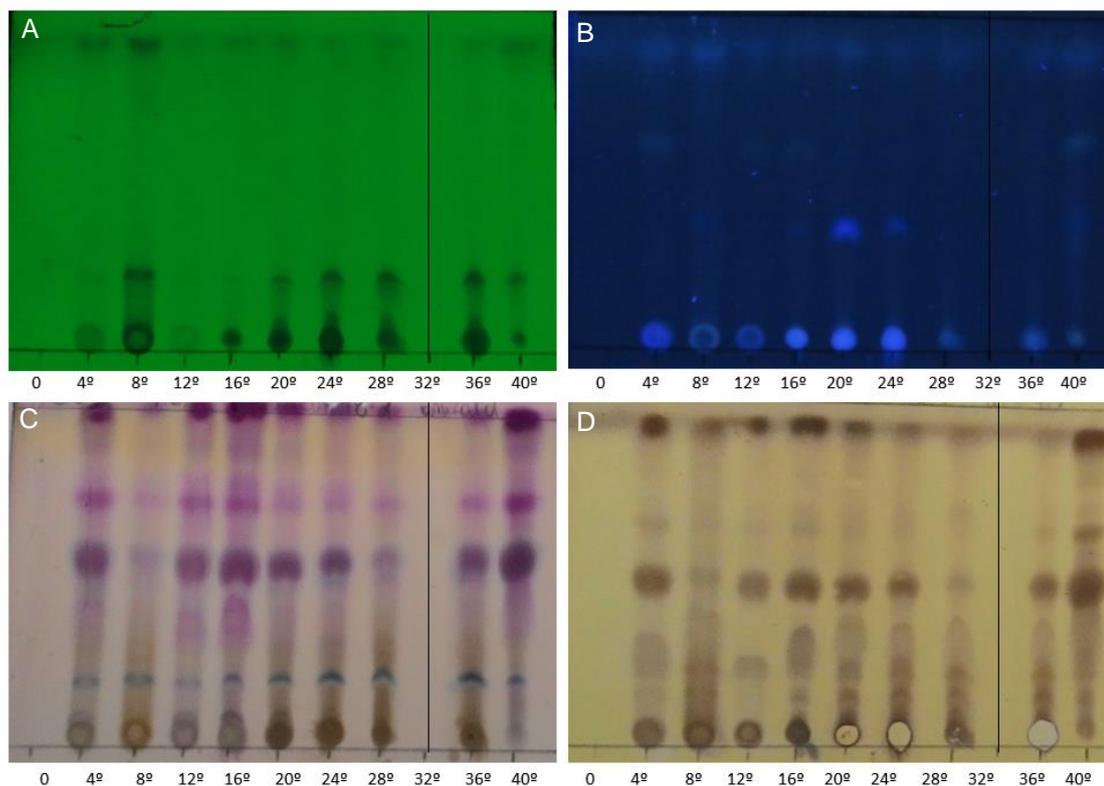
**Figura 38.** CCDC dos extratos acetato de etila das amostras da curva de crescimento das calos eluídos com AcOEt/MeOH 98:2.



Legenda: A: 264 nm. B: 365nm. C: anisaldeído sulfúrico. D:  $Ce(SO_4)_2$ .

Na figura 39 são mostradas as CCDCs dos extratos hexânicos da suspensão celular e foi possível observar nas placas A e B que houve variações na intensidade da fluorescência e possivelmente nas concentrações das moléculas. Em C é observada a predominância da cor rosa e roxa, indicando a presença de esteroides e terpenoides nos extratos. Além disso, uma banda com coloração azul, mais próxima da origem, foi observada em todos os intervalos analisados, indicando a presença de iridoides ou substâncias glicosiladas.

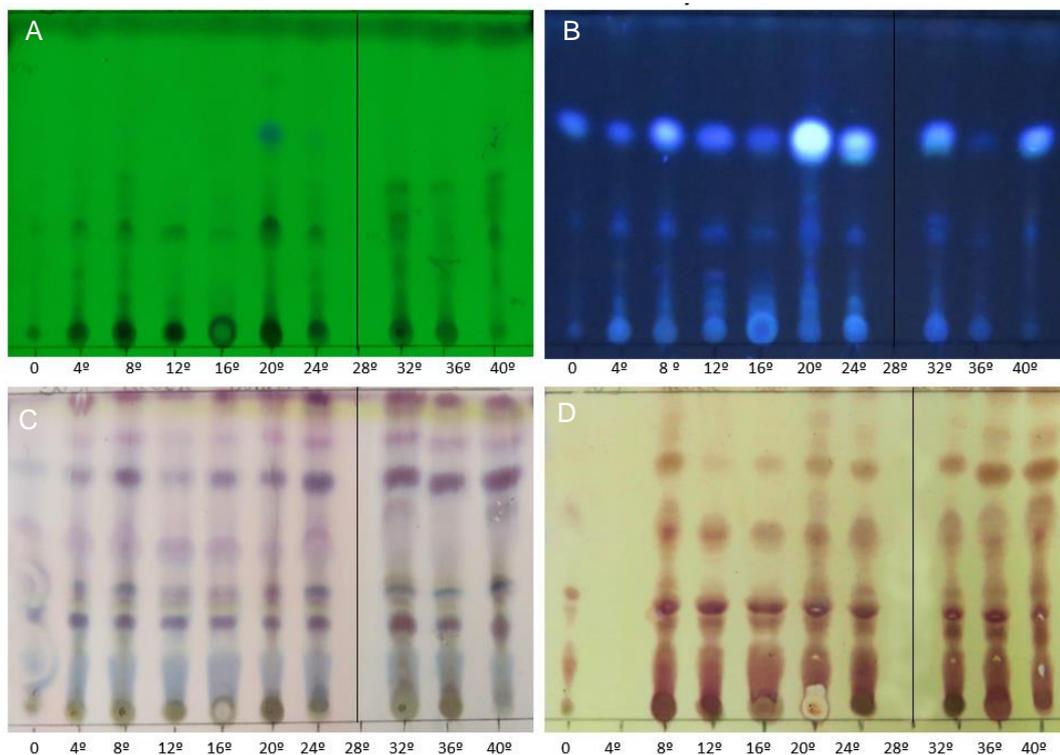
**Figura 39.** CCDC dos extratos hexânicos das amostras da curva de crescimento das suspensões celulares eluídos com DCM/MeOH 98:2.



Legenda: A: 264 nm. B: 365nm. C: anisaldeído sulfúrico. D:  $Ce(SO_4)_2$ .

Na figura 40, são mostradas as CCDCs dos extratos AcOEt da suspensão celular. Foi observado em A e B a presença de substâncias com intensa fluorescência quando revelados nas lâmpadas UV, principalmente no 365 nm. Nitidamente houve um pico na concentração de moléculas no 20º dia de cultivo. Na placa C as cores reveladas com anisaldeído sulfúrico foram rosa, roxo, azul e verde amarelado, indicando a possível presença de esteroides, terpenoides, iridoides e substâncias glicosiladas. A composição química ao longo do tempo de cultivo permaneceu sem muitas alterações.

**Figura 40.** CCDC dos extratos acetato de etila das amostras da curva de crescimento das suspensões celulares eluídos com AcOEt/MeOH 95:5.



Legenda: A: 264 nm. B: 365nm. C: anisaldeído. D:  $Ce(SO_4)_2$

A partir das análises dos espectros de RMN de  $^1H$  dos extratos hexânicos e AcOEt (figura 41 e 42, respectivamente) obtidos das culturas de calos e células em suspensão ao longo de 40 dias de cultivo, foi verificado que não houve diferença significativa entre os extratos ao longo do tempo de cultivo e entre os tipos de cultura. Em análise comparativa por RMN de  $^1H$  de todos os extratos hexânicos e todos os extratos AcOEt é possível afirmar que não houve grande variação na produção de metabólitos, no qual os extratos demonstraram apresentar uma composição química muito semelhante. Entre os extratos hexânicos e AcOEt houveram variações na concentração e composição química de moléculas presentes.

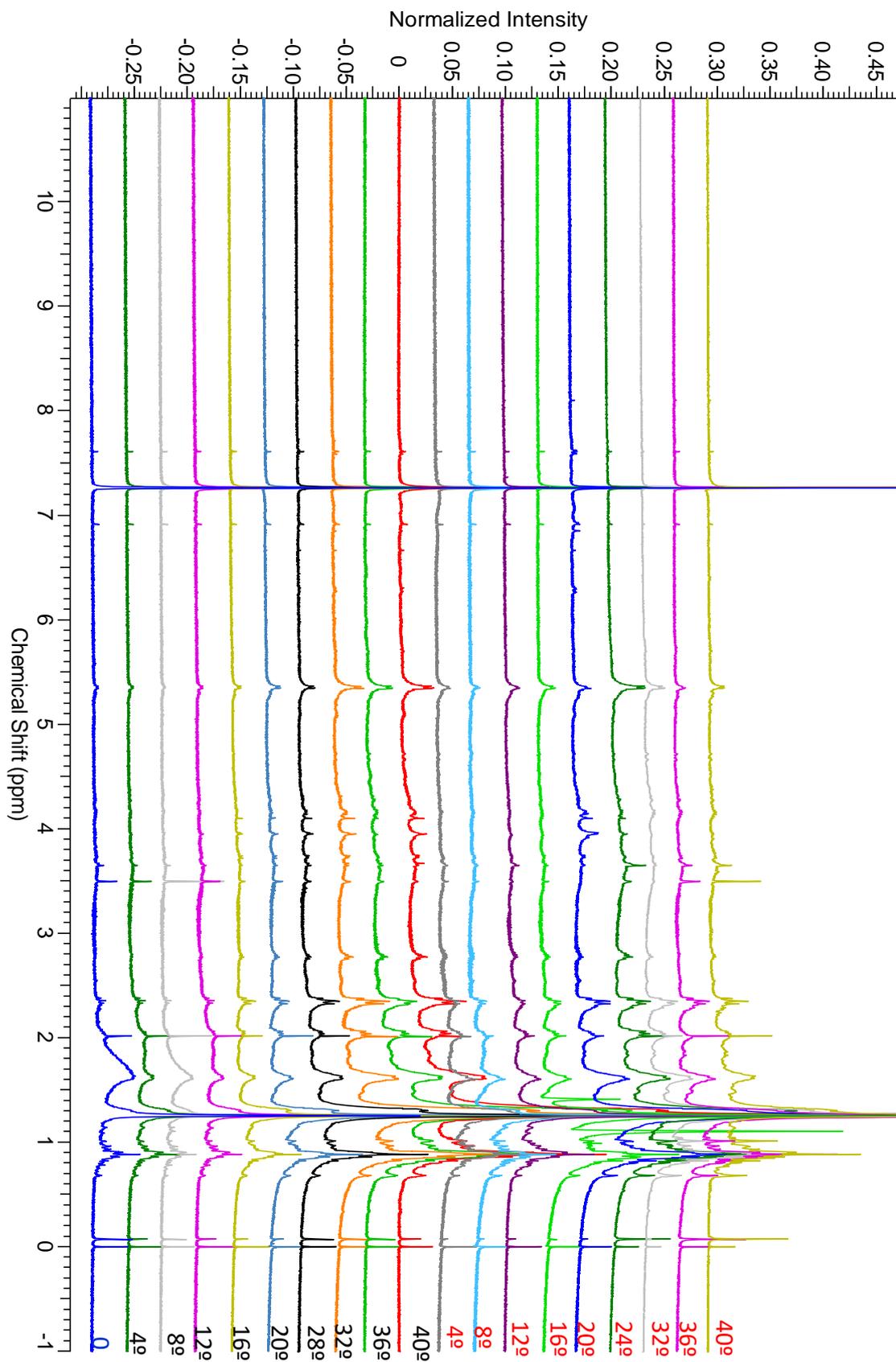
Levando em consideração que as plantas em ambientes com poucas variações ambientais podem apresentar menores oscilações metabólicas da mesma forma que grandes variações podem apresentar maiores oscilações metabólicas (GOBBO-NETO & NETO, 2007), a cultura de células vegetais *in vitro*, quando mantida sob condições controladas e na ausência de estresses químicos, biológicos

e físicos induzidos, faz com que composição química dos extratos, ao longo do tempo de cultivo, tenha características bastante similares.

A variação observada foi relativa à concentração dos metabólitos, visto que as massas dos extratos oscilaram ao longo do tempo de cultivo. De modo que, quando maior a massa do calo ou células em suspensão, maior foi a concentração de algumas classes de metabólitos secundários. Nas figuras 41 e 42, tanto na imagem normal quando extrapolando a intensidade dos sinais, foi observado que os deslocamentos químicos são os mesmos para os extratos, variando apenas quanto a concentração. No entanto, uma análise quimiométrica mais aprofundada deverá ser realizada para verificar se houve ou não diferenças entre os tempos de cultivo das culturas de calos e suspensões celulares.



**Figura 42.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos AcOEt de culturas de calos (destacado em PRETO) e células em suspensão (destacado em VERMELHO), no tempo zero (destacado em AZUL) e ao longo de 40 dias de cultivo em meio de cultura semissólido e líquido (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).



## 6. CONCLUSÃO GERAL

- O estudo fitoquímico dos extratos dos calos de *D. saccifera* possibilitou verificar a presença de metabólitos secundários, como terpenoides, esteroides, substâncias aromáticas, ácidos graxos, entre outros.
- Foi possível identificar o indício da presença do esteroide lupen-3-ona no extrato hexânico dos calos de *D. saccifera*.
- O extrato AcOEt apresentou alta atividade antimicobacteriana frente *Mycobacterium tuberculosis*, com CIM, IC<sub>90</sub> e CBM de 25, 19,5 e 200 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.
- Os extratos avaliados não apresentaram atividade antimicrobiana significativa frente às bactérias testadas, assim como não apresentaram atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH e ao complexo F<sup>3+</sup>/fenantrolina.
- A curva de crescimento do calo seguiu um padrão de crescimento lento e aparentemente linear, durante o tempo de cultivo avaliado, que deve ser alterado.
- A cultura de células em suspensão da espécie *D. saccifera* pode ser estabelecida a partir da transferência do calo para o meio líquido.
- O acúmulo de biomassa e o crescimento da cultura de células *in vitro* de *D. saccifera* foi expressivamente maior quando em meio líquido sob agitação contínua do que o crescimento dos calos.
- Não foi possível determinar com exatidão a fase estacionária no crescimento de calos e suspensões celulares, no entanto, pode-se inferir que a produção máxima de metabólitos secundários ocorre no 40<sup>o</sup> e do 24<sup>o</sup> ao 36<sup>o</sup> dia de cultivo, respectivamente.
- Os parâmetros cinéticos calculados demonstram que a suspensão celular possui um elevado potencial para o fornecimento de biomassa vegetal da espécie, tornando-se uma fonte promissora para a produção de metabólitos secundários obtidos *in vitro*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEBIYI, A.; AYO, R.; BELLO, I.; HABILA, J. Phytochemical screening and anti-TB activity of root extracts of *Guiera senegalensis* (J. F. Gmel). **Amer. Journal Bioscience and Bioengineering**, 3: 208–213, 2015.
- AHMAD, N.; SHINWARI, Z.K.; HUSSAIN, J.; AHMAD, I. Insecticidal activities and phytochemical screening of crude extracts and its derived fractions from three medicinal plants *Nepeta leavigata*, *N. kurramensis* and *Rhynchosia reniformis*. **Pakistan Journal of Botany**., 48(6): 2485-2487, 2016.
- ALONSO-HERRADA, J.; RICO-RESÉNDIZ, F.; CAMPOS-GUILLÉN, J.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R.G.; TORRES-PACHECO, I.; CRUZ-HERNÁNDEZ, A. Establishment of *in vitro* regeneration system for *Acaciella angustissima* (Timbe) a shrubby plant endemic of México for the production of phenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, 86: 49-57, 2016.
- AL-SNAFI, A.E. Medicinal plants possessed anti-inflammatory antipyretic and analgesic activities (part 2) - plant based review. **Scholars Academic Journal of Pharmacy**, 5(5): 142-158. 2016.
- ALVES, H.S.; ROCHA, W.R.V.; FERNANDES, A.F.C.; NUNES, L.E.; PINTO, D.S.; COSTA, J.I.V.; CHAVES, M.C.O.; CATÃO, R.M.R. Actividad antimicrobiana de productos obtenidos a partir de especies de *Piper* (Piperaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, 21(2): 168-180, 2016.
- ANJUSHA, S.; GANGAPRASAD, A. Callus culture and *in vitro* production of anthraquinone in *Gynochthodes umbellata* (L.) Razafim. & B. Bremes (Rubiaceae). **Industrial Crops and Products**, 95: 608-614, 2017.
- AQUINO, R.; DE TOMMASI, N.; TAPIA, M.; LAURO, M.R.; RASTRELLI, L. New 3-Methoxyflavones, and iridoid lactone and a flavonol from *Duroia hirsuta*. **Journal of Natural Products**, 62(4): 560-562, 1999.
- AZEVEDO, K. S. Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) Dissertação de

- mestrado em Agronomia. 2003b. UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. 86 p.
- AZEVEDO, M.C.A. Bioprospecção: coleta de material biológico com a finalidade de explorar recursos genéticos. **Conselho da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica**, 2ª ed., caderno 17, 2003a, 35p.
- BÁNYAI, P.; KUZOVKINA, I.N.; KURSINSZKI, L.; SZÓKE, E. HPLC analysis of alizarin and purpurin produced by *Rubia tinctorum* L. hairy root cultures. **Chromatographia**, 63(13): 111–114, 2006.
- BARBOSA, M.R.; ZAPPI, D.; TAYLOR, C.; CABRAL, E.; JARDIM, J.G.; PEREIRA, M.S.; CALIÓ, M.F.; PESSOA, M.C.R.; SALAS, R.; SOUZA, E.B.; DI MAIO, F.R. ; MACIAS, L.; ANUNCIAÇÃO, E.A. DA; GERMANO FILHO, P.; OLIVEIRA, J.A.; BRUNIERA, C.P.; M. GOMES; DE TONI, K.; FIRENS, M. *Rubiaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB210>>. Acessado em: 10/03/2017.
- BECERRA-ARTEAGA, A., MASON, H.S. AND SHULER, M.L., Production, secretion, and stability of human secreted alkaline phosphatase in tobacco NT1 cell suspension cultures, **Biotechnology Progress**, 22(6): 1643-1649, 2006.
- BERG, J.M.T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 545p.
- BHARATHI, P.; PHILOMINA, D. Effect of nutritional factors and precursors on the formation of colchicine in *Gloriosa superba in vitro*. **Research Journal of Biotechnology**, 1: 29-37, 2010.
- BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, D.H.S.; LOPES, M.N. Secondary metabolites from Brazilian Rubiaceae plant species: chemotaxonomical and biological significance. **Recent Research Developments in Phytochemistry**, 5: 19-31, 2001.

- BONA, C.M.; SANTOS, G.D.; BIASI, L.A. Lavandula calli induction, growth curve and cell suspension formation. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, 7(1): 17-23, 2012.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, 161: 839–851, 2001.
- BREMER, B. A review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 96(1): 4-26, 2009.
- BRODELIUS, P. Utilization of plant cell cultures for production of biochemicals. **Hereditas Supplement**, 3: 73-81, 1985.
- BRUFAU, G.; CANELA, M. A.; RAFECAS, M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**, 28(4): 217-225, 2008.
- CALLAWAY, J.C.; RAYMON, L.P.; HEARM, W.L.; MCKENNA, D.J.; GROB, C.S.; BRITO, G.S.; MASH, D.C. Quantitation of *N,N*-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. **Jornal of Analytical Toxicology**, 20(6): 492-497, 1996.
- CAMPOS M.T.V.A.; BRITO J.M. Rubiaceae. In: RIBEIRO E.L.S.; HOPKINS M.J.G.; VINCENTINI. A. Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. INPA ed., 1999. p. 626-33.
- CARTER, M.J.; ANDEL, G.E.V. **Therapeutic Recreation: A practical approach**. 4<sup>a</sup> ed. Waveland press. 2011.
- CASTRO, A.H.F.; LIMA, M.M.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; SÓTER, M.O. Curva de crescimento, atividade da fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais em calos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae-Mimosoideae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, 4(2): 99-104, 2008.
- CASTRO, A. H. F.; BRAGA, K.Q.; SOUSA, F.M.; COIMBRA, M.C.; CHAGAS R.C.R. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from

- Byrsonima verbascifolia* (L.) DC (Malpighiaceae). **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, 47(1): 143-151, 2016.
- CAVALCANTE, P.B. Frutas comestíveis da Amazônia, Repositório Museu Goeldi, Publicações Avulsas 27, 1974.
- CHEN, W.; VILJOEN, A.M. Geraniol - a review of a commercially important fragrance material. **South African Journal of Botany** 76: 643-651, 2010.
- CHENG, D.M.K. Phytochemical. In: SCHMIDT, B.M.; CHENG, D.M.K. **Ethnobotany: A Phytochemical Perspective**. Nova Jersey: Wiley, 2017. cap 2, p.111-142.
- CHOI, S.M.; LEE, O.S., KWON, S.Y., KWAK, S.S., YU, D.Y. AND LEE, H.S. High expression of a human lactoferrin in transgenic tobacco cell cultures, **Biotechnology Letters**, 25(3): 213-218, 2003.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 6<sup>a</sup> ed., 2003.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement (M100-S23). 2013.
- CORBIN, J.M.; HASHIMOTO, B.I.; KARUPPANAN, K.; KYSER, Z.R.; WU, L.; ROBERTS, B.A.; NOE, A.R.; RODRIGUEZ, R.L.; MCDONALD, K.A.; NANDI, S. Semicontinuous bioreactor production of recombinant butyrylcholinesterase in transgenic rice cell suspension cultures, **Plant Biotechnology**, 7(1): 1-10, 2016.
- CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, 15(3): 183-205. 2001.
- COSTA, P., GONÇALVES. S., VALENTÃO. P., ANDRADE, P. B., COELHO, N., ROMANO, A. *Thymus lotocephalus* wild plants and *in vitro* cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. **Food Chemistry**, 135: 1253-1260, 2012.
- CONTRERAS-MEJIA, J.A. Estudo fitoquímico do extrato hexânico das folhas de *Duroia saccifera* (Mart. ex Roem & Schult.) Hook. F ex Schumann

- (RUBIACEAE). Dissertação de Mestrado em Química. 2017. UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Estados Unidos: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.
- CUSIDO, R.M.; ONRUBIA, A.; SABATER-JARA, A.B.; MOYANO, E. BONFILL, M. GOOSSENE, A.; PEDREÑO, M.A.; PALAZON, J. A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp **Biotechnology Advances**, 32: 1157–1167, 2014.
- DAVIES, K.M.; DEROLES, S.C. Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology, **Current Opinion in Biotechnology**, 26: 133-140. 2014.
- DEEPTHI, S.; SATHEESHKUMAR, K. Enhanced camptothecin production induced by elicitors in the cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* Linn. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 124: 483–493, 2016.
- DELPRETE, P.G. Rubiaceae. In: SMITH, N.P. **Flowering plant families of the American tropics**. Princeton University Press, New York: Botanical Garden Press, 2004. p.328-333.
- DELPRETE, P.G.; JARDIM, J.G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. **Rodriguésia**, 63(1): 101-128, 2012.
- DIXON, R.A. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In Plant Cell Culture; a Practical Approach. IRL Press (ed. Dixon, R.A.), 1985. p. 1-20.
- DONG, H.D.; ZHONG, J.J. Enhanced taxane productivity in bioreactor cultivation of *Taxus chinensis* cells by combining elicitation, sucrose feeding and ethylene incorporation, **Enzyme and Microbial Technology**, 31(1-2): 116-121, 2002.

- ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, 64: 711-713. 1998.
- ENRIQUEZ, G. Amazônia - Rede de inovação de dermocosméticos: Sub-rede de dermocosméticos na Amazônia a partir do uso sustentável de sua biodiversidade com enfoques para as cadeias produtivas da castanha-do-pará e dos óleos de andiroba e copaíba. **Parcerias Estratégicas**, Brasília, v.14, n. 28, p.51-118, 2009.
- FAN, X.; HUN, G.H.; LI, N.; HAN, Z.F.; JIA, J.M. Effects of lovastatin, clomazone and methyl jasmonate treatment on the accumulation of purpurin and mollugin in cell suspension cultures of *Rubia cordifolia*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 11(4): 396-400, 2013.
- FLORA DO BRASIL, 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB24442>>. Acesso em: 27/03/2017.
- FLORES-SÁNCHEZ, I.J.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; MONTES-HORCASITAS, M.C.; RAMOS-VALDIVIA, A.C. Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension Cultures of *Uncaria tomentosa*. **Plant Cell Physiology**, 43(12): 1502–1509, 2002.
- FRANÇA, S.C. Bioprocessos inovadores para a produção de metabólitos ativos de plantas. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (Ed). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre/RS: Editora ARTMED, 2017. p. 39-52.
- FREDERICKSON, M.E.; GREENE, M.J.; GORDON, D.M. Ecology: 'Devil's gardens' bedevilled by ants, **Nature**, 437: 495-496, 2007.
- FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.J.B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18(4): 627-641. 2008.

- GANDHI, G.R.; BARRETO, P.G.; LIMA, B.S.; QUINTANS, J.S.S.; ARAÚJO, A.A.S.; NARAIN, N.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; GURGEL, R.Q. Medicinal plants and natural molecules with *in vitro* and *in vivo* activity against rotavirus: A systematic review. **Phytomedicine**, 23: 1830–1842, 2016.
- GAOSHENG, H.; JINGMING, J. Production of the useful secondary metabolites through the regulation of biosynthetic pathway in the cell & tissue suspension culture of medicinal plants. In: Gaosheng H, Jingming J (eds) Recent advances in plant *in vitro* culture. **INTECH**, Rijeka. 2012.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. Plant propagation by tissue culture. 3. Ed. Dordrecht: The Background, v.1, 501p., 2008.
- GIBBS, R.D. History of chemical taxonomy. In: Swain T, editory. **London: Academic**, 41-48. 1963.
- GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M.T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, 66: 89-98, 2005.
- GORELICK, J.; BERNSTEIN, N. Elicitation: An Underutilized Tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. In: SPARKS, D.L. **Advances of Agronomy**, San Diego: Elsevier, 2014. p. 201-230.
- GROB, C.S.; MCKENNA, D.J.; CALLAWAY, J.C.; BRITO, G.S.; NEVES, E.S.; OBERLAENDER, G.; SAIDE, O.L.; LABIGALINI, E.; TACLA, C.; MIRANDA, C.T. Human psychopharmacology of hoasca, a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. **Jornal of Nervous and Mental Disease**, 184(2): 84-94, 1996.
- HE, S.; ZHU, J.; ZI, J.; ZHOU, P.; LIANG, J.; YU, R. A novel terpenoid indole alkaloid derived from catharanthine via biotransformation by suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus*. **Biotechnology Letters**, 37: 2481–2487. 2015.
- HEITZMAN, M.E.; NETO, C.C.; WINIARZ, E.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, 66(1): 5-29, 2005.

- HIROYUKI, T.; TAKEDA, Y.; HIROSHI, N.; KANOMI, A.; OKUDA, T & PUFF, C. Chemotaxonomic studies of Rubiaceae plants containing iridoid glycosides. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2591-2598, 1988.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EDUFSCAR, 2003. 152p.
- INDU, S.; VIJAYA, L.; MEETA, B.; JOSSY, V.; NARESH, C. Production of flavonoids in callus culture of *Anthocephalus indicus* A. Rich. **Asian Journal of Plant Sciences**, 12: 40-45, 2013.
- ISAH, T. Anti-cancer alkaloids from trees: development into drugs. **Pharmacognosy Review**, 10(20): 90-99. 2016.
- ISAH, T.; UMAR, S.; MUJIB, A.; SHARMA, M.P.; RAJASEKHARAN, P.E.; ZAFAR, N.; FRUKH, A. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant *in vitro* cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 132(2): 239–265. 2017.
- JHA, S.; SAHUA, N.P.; SEN, J.; JHA, T.B.; MAHATO, S.B. Production of emetine and cephaeline from cell suspension and excised root cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. **Phytochemistry**, 30(12): 3999-4003, 1991.
- JAWDAT, D.; AL-FAOURY, H.; ODEH, A.; AL-RAYAN, A.; AL-SAFADI, B. Essential oil profiling in callus of some wild and cultivated *Daucus* genotypes. **Industrial Crops and Products**, 94: 848–855, 2016.
- KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *In vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, 3(13): 1222-1239, 2009.
- KETCHUM, R.E.B.; GIBSON, D.M.; GALLO, L.G. Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 42: 185-193, 1995.
- KHAN, M.T.H.; ATHER, A.; THOMPSON, K.D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses, **Antiviral Research**, 67(2): 107-119, 2005.

- LIMA, E. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C. Avaliação bioquímica do desenvolvimento de calos *in vitro* a partir de segmentos foliares de sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.). **Magistra**, 19(3): 184-190, 2007.
- LOPES, S.O.; MORENO, P.R.H.; HENRIQUES, A.T. Growth characteristics and chemical analysis of *Psychotria carthagenensis* cell suspension cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, 26: 259–264, 2000.
- LOPEZ, A.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 77(2): 189-196, 2001.
- LOREDO-CARRILLO, S.E.; SANTOS-DÍAZ, M.L.; LEYVA, E.; SANTOS-DÍAZ, M.S. Establishment of callus from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers and effect of abiotic stress on flavonoids and sterols accumulation. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, 22(3): 312-318. 2013.
- MANEECHAI, S.; DE-EKNAMKUL, W.; UMEHARA, K.; NOGUCHI, H.; LIKHITWITAYAWUID, K. Flavonoid and stilbenoid production in callus cultures of *Artocarpus lakoocha*. **Phytochemistry**, 81: 42-49. 2012.
- MARTINS, D.; CARRION, L.L.; RAMOS, D.F.; KAHLIL, S.S.; SILVA, P.E.A.; BARISON, A.; NUNEZ, C.V. Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). Hindawi **BioMed Research International**, p. 1-7, 2013.
- MARTINS, D., FACHIN-ESPINAR, M. T., OLIVEIRA, T. A., LIMA, K. C. S., CAVALCANTE, R. M., TELES, B. R., NUNEZ, C. V. Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, 2(6): 158-171. 2014.
- MARTINS, D., NUNEZ, C.V. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. **Molecules**, 20(7): 13422-13495, 2015.
- MESQUITA, D.W.O.; MESQUITA, A.S.S.; CURSINO, L.M.C.; SOUZA, E.S.; OLIVEIRA, A.C.; PINHEIRO, C.C.S.; NOVAES, J.A.P.; OLIVEIRA, J.A.A.; NUNEZ, C.V. Atividades biológicas de espécies amazônicas de Rubiaceae. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, 17(4): 604-613. 2015.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, 15(3): 473-497. 1962.
- MURTHY, H.N.; LEE, E.J.; PAEK, K.Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 118(1): 1-16, 2014.
- MUSTAFA, N.R.; WINTER, W.; IREN, F.; VERPOORTE, R. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. **Nature Protocols**, 6(6): 715-742. 2011.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, 79: 629-661. 2016.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Análise ultraestrutural de calos embriogênicos de Murici-pequeno (*Brysonima intermédia* A. Juss). **Revista Brasileira de Biociências**, 5(2): 48-50, 2007.
- NOVA-LÓPEZ, C.J.; MUÑOZ-PÉREZ, J.M.; GRANGER-SERRANO, L.F.; ARIAS-ZABALA, M.E.; ARANGOISAZA, R.E. Expresión de la proteína recombinante Cry 1Ac en cultivos de células de papa en suspensión: Establecimiento del cultivo y optimización de la producción de la biomasa y la proteína mediante la adición de nitrógeno. **DYNA**, 84(201): 34-41, 2017.
- NUNEZ, C.V.; SANTOS, P.A.; ROUMY, V.; HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; MESQUITA, S.A.M.; BAILLEUL, F. Ranitidine isolated from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Planta medica**, 75, 2009.
- NUNEZ, C.V.; ROUMY, V.; MESQUITA, D.W.O.; MESQUITA, A.S.S.; SAHPAZ, S.; BAILLEUL, F.; HENNEBELLE, T. Indole alkaloids from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae), **Planta Medica**, 78, 2012a.
- NUNEZ, C.V.; VASCONCELOS, M.C. NOVO ALCALOIDE ANTITUMORAL DE *Duroia macrophylla*. 2012b, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI10201203380, data de depósito: 31/12/2012, título: "NOVO ALCALOIDE ANTITUMORAL DE DUROIA MACROPHYLLA", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

- NUNEZ, C.V.; MARTINS, D.; RAMOS, D.F.; SILVA, P.E.A. Uso de composto, método *ex vivo*, processo e extrato purificado. 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140308636, data de depósito: 09/12/2014, título: "USO DE COMPOSTO, MÉTODO EX-VIVO, PROCESSO E EXTRATO PURIFICADO", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Instituição financiadora: CNPq.
- OCHOA-VILLARREAL, M.; HOWAT, S.; HONG, S.; JANG, M.O.; JIN, Y.W.; LEE, E.K.; LOAKE, G.J. Plant cell culture strategies for the production of natural products. **BMB Rep**, 49 (3): 149-158. 2016.
- OMAR, R.; ABDULLAH, M.A.; HASAN, M.A.; ROSFARIZAN, M.; MARZIAH, M. Kinetics and modelling of cell growth and substrate uptake in *Centella asiatica* cell culture. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 11(3): 223-226, 2006.
- PAGE, J.E.; MADRIÑÁN, S.; TOWERS, G.H.N. Identification of a plant growth inhibiting iridoid lactone from *Duroia hirsuta*, the allelopathic tree of the 'Devil's Garden'. **Experientia**, 50(9): 840-842, 1994.
- PAULI, G.F.; CASE, R.J.; INUI, T.; WANG, Y.; CHO, S.; FISCHER, N.H.; FRANZBLAU, S.G. New perspectives on natural products in TB drug research. **Life Sciences**, 78(5): 485-494, 2005.
- PERAZZO, F.F. in CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos antiinflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: Tecmedd, 2004. 423p.
- PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, 3(4): 146-152, 2012.
- PILATTI, F.K.; AGUIAR, T.; SIMÕES, T.; BENSON, E.E.; VIANA, A.M. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 27: 82-98, 2010.
- PINTO, A.C. Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**, 18(6): 608-615, 1995.

- POSER, G.L. A quimiotaxonomia na sistemática dos seres vivos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (Ed). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento.** Porto Alegre/RS: Editora ARTMED, 2017. p. 23-28.
- PUPO, M.T.; GUIMARÃES, D.O.; FURTADO, N.A.J.C.; BORGES, W.S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In: Taft, C. A. Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry. **Kerala: Research Signpost**, 51-78. 2006.
- RAMOS, D.F.; LEITÃO, G.G.; COSTA, F.N.; ABREU, L.; VILLARREAL, J.V.; LEITÃO, S.G.; SAID Y FERNÁNDEZ, S.L.; SILVA, P.E.A. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from brasilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 44(4): 669-674, 2008.
- RAO, S.R.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, 20: 101-153. 2002.
- RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.; LOHMANN, L.; ASSUNÇÃO, P.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. Flora da Reserva Ducke, Guia de identificação das plantas em uma floresta de terra firme na Amazônia Central, Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia (INPA) e Department for International Development (DFID), 1999.
- RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. Botânica econômica brasileira, Rio de Janeiro: Editora Âmbito Cultural, 1995.
- ROMERO-BENAVIDES, J.C.; RUANO, A.L.; SILVA-RIVAS, R.; CASTILLO-VEINTIMILLA, P.; VIVANCO-JARAMILLO, S.; BAILON-MOSCOSO, N. Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. **European Journal of Medicinal Chemistry** 129: 209-217, 2017.
- SANTOS, M. R. A. Germinação, calogênese e caracterização e saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach. Dissertação de Mestrado em Fitotecnia. UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 2007. 81f.

- SANTOS, M.R.A.; FERREIRA, M.G.R.; SARUBO, V. Determination of callus growth curve in conilon coffee. **Revista Caatinga**, 23(1): 133-136, 2010.
- SATYANARAYAN, N.D.; AL-BAADANI, W.A.; SHEKHAR, S.P.; AND HARISH-KUMAR, S. Anti-tubercular activity of various solvent extracts of *Acalypha indica* L. against drug susceptible H37RV strain. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 5: 957–965, 2016.
- SERRA, A.G.P.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O. Análise bioquímica de calos formados de explantes foliares de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). **Ciência e Agrotecnologia**, 24(4): 833-840, 2000.
- SHIMIZU, T.; CLITTON, A.; KOMAMINE, A.; FOWLER, M.W. Changes in metabolite levels during growth of acer pseudoplanatus (sycamore) cells in batch suspension culture. **Physiologia Plantarum**, 40(2): 125-129, 1977.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre/RS: Editora ARTMED, 2017.
- SMITH, R.M. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. San Diego: Academic Press, 1992. 171 p.
- SMETANSKA, I. 2008. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. In: STAHL, U.; DONALIES, U.E.B.; NEVOIGT, E. *Advances in biochemical engineering/biotechnology: food biotechnology*, Springer, v.11, Berlin. p 187–228.
- SOUZA, J. C. Obtenção de calos de *Duroia saccifera* (Rubiaceae), estudo químico e avaliação biológica dos seus metabólitos. Tese de doutorado em Biotecnologia. 2016. UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 704p.
- SPRENGER, L.K. Atividade ovicida e larvicida do extrato etanólico de *Aloe vera* L. sobre *Haemonchus contortus*. **Revista brasileira de Ciência Veterinária**, 22(3-4): 152-156, 2015.

- STELLA, A.; BRAGA, M.R. Callus and cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 68: 271–276, 2002.
- STOJAKOWSKA, A.; MALARZ, J. Bioactive phenolics from *in vitro* cultures of *Lactuca aculeata* Boiss. et Kotschy. **Phytochemistry Letters**, 19: 7-11, 2017. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/310050496\\_Bioactive\\_phenolics\\_from\\_in\\_vitro\\_cultures\\_of\\_Lactuca\\_aculeata\\_Boiss\\_et\\_Kotschy](https://www.researchgate.net/publication/310050496_Bioactive_phenolics_from_in_vitro_cultures_of_Lactuca_aculeata_Boiss_et_Kotschy)>. Acesso em: 02/03/2017.
- SZABADOS, L.; MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. 1991. Suspensiones celulares: Descripción, manipulación y aplicaciones. In: Roca, William M.; Mroginski, Luis A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. p. 173-210.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- TAKAYAMA, H. Chemistry and pharmacology of analgesic indole alkaloids from the rubiaceous plant, *Mitragyna speciosa*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 52(8): 916-928, 2004.
- TAYLOR, C.M.J.A.; STEYERMARK, P.G.; DELPRETE, A.; VINCENTINI, R.; CORTÊS, D.; ZAPPI, C.; PERSSON, C.B.; COSTA, E.J.A.; STEYERMARK, J.S.; STEYERMARK, P.E.; BERRY, B.K. Rubiaceae: Flora of the Venezuelan Guayana. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 8: 497-848, 2004.
- TAYLOR, C.M.; CAMPOS, M.T.V.A.; ZAPPI, D. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. **Rodriguésia**, 58(3): 549-616, 2007.
- TERMIGNONI, R.R. Cultura de tecidos vegetais. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005. 182p.
- THE PLANT LIST. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Rubiaceae/>> Acesso em: 06/02/2018.

THE PLANT LIST. Disponível em: <[www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=duroia](http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=duroia)>  
Acesso em: 06/02/2018.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGICO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.

TOSO, R.D.; MELANDRI, F. Sustainable sourcing of natural food ingredients by plant cell cultures. **Agro Food Industry Hi-Tech**, 22(2): 26-28. 2011.

VASCONCELOS, J. N. C.; CARDOSO, N. S. N.; OLIVEIRA, L. M.; SANTANA, J. R. F.; FERNANDEZ, L. G.; BELLO KOBLITZ, M. G.; SILVA, M.L.C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 14(4): 592-597, 2012.

VASILEV, N.; GRÖMPING, U.; LIPPERTS, A.; RAVEN, N.; FISCHER, R.; SCHILLBERG, S. Optimization of BY-2 cell suspension culture medium for the production of a human antibody using a combination of fractional factorial designs and the response surface method. **Plant Biotechnology Journal**, 11: 867–874. 2013.

WANG, J.; LI, J.; LI, J. LIU, S.; HUANG, L.; GAO, W. Production of active compounds in medicinal plants: from plant tissue culture to biosynthesis. **Chinese Herbal Medicines**, 9(2):115-125. 2017.

WANI, M.; TAYLOR, H.; WALL, M.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J Am Chem Soc**, 93: 2325–2327, 1971.

WILSON, S.A.; ROBERTS, S.C. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. **Plant Biotechnology Journal**, 10: 249–268. 2012.

WINSOR, C.P. The Gompertz Curve as a Growth Curve. **National Academy of Sciences**, 18(1): 1-8, 1932.

YOUNG, M.C.M.; BRAGA, M.R.; DIETRICH, S.M. C.; BOLZANI, V.S.; TREVISAN, L.M.V.; GOTTLIEB, O.R. Chemosystematic markers of Rubiaceae. **Opera Botanica Belgica**, 7: 205. 1996.

- ZABALA, M.A.; ANGARITA, M.; RESTREPO, J.M.; CAICEDO, L.A.; PEREA, M. Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. **Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 46(3): 233-238, 2009.
- ZANCA, S.S.; COSTA, R.C.; NUNEZ, C.V. *In vitro* callus induction of *Duroia macrophylla* Huber, chemical prospection and biotechnological potentialities of its extracts. **Scientific Pages Bot**, 1(1): 1-7, 2016.
- ZHAO, J.; DAVIS, L.C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, 23(4): 283-333. 2005.
- ZHONG, J.J.; KONSTANTINOV, K.B.; TOSHIDA, T. Computer aided online monitoring of physiological variables in suspended cell cultures of a *Perilla frutescens* in a bioreactor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 77: 445-447. 1994.